

**Einfluss des probiotischen *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) auf
die Infektion mit atypischen enteropathogenen *E. coli* (aEPEC) im
porcinen in vitro-Modell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Ing. agr. Sylvia Kleta

geb. am 10.03.1977 in Pritzwalk

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h. c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Lothar H. Wieler

2. Prof. Dr. Erwin Schneider

3. Prof. Dr. Ortwin Simon

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2008

Die Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Lothar H. Wieler am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin sowie unter der Leitung von Prof. Dr. Erwin Schneider am Insitut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR 438), der Berliner Graduiertenförderung (NaFöG) und der FAZIT-Stiftung gefördert.

Für Dich, Mutti!

Egal wie klein die Dinge auch sind, mit denen ich mich beschäftige,
in Deinen Augen vollbringe ich immer etwas ganz Großartiges.

Und für Dich, Anke!

Mit Deiner Hilfe werden manche dieser kleinen Dinge groß.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary.....	2
1 Einleitung	3
1.1 Intestinale Mikrobiota	3
1.2 <i>Escherichia coli</i>	7
1.3 Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	8
1.3.1 Bedeutung und Pathogenese	8
1.3.2 <i>Locus of Enterocyte Effacement</i> (LEE)	10
1.3.3 Typ 3-Sekretionssystem (T3SS).....	11
1.3.4 Effektorproteine	12
1.3.5 Podestbildung.....	14
1.3.6 Regulation der Virulenzgenexpression	16
1.4 Probiotika	16
1.4.1 Allgemeine Betrachtungen	16
1.4.2 Wirkung von Probiotika beim Schwein	17
1.4.3 <i>E. coli</i> Nissle 1917 (EcN).....	21
1.5 Zielstellung der Arbeit	23
2 Material	24
2.1 Zelllinie.....	24
2.2 Bakterienstämme	24
2.3 Plasmide und Vektoren.....	25
2.4 Oligonukleotide	26
2.5 Antikörper.....	28
2.6 Chemikalien, Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe.....	28
2.7 Kits	28
2.8 Größenmarker.....	29
2.9 Lösungen und Medien	29
2.9.1 Allgemeine Lösungen	29
2.9.2 Medien für die Zellkultur	29
2.9.3 Nähr- und Selektivmedien für die Bakterienkultur	30
2.10 Verbrauchsmaterial	31
2.11 Geräte	31
3 Methoden	33
3.1 Mikrobiologische Methoden	33

3.1.1	Bakterienkultur.....	33
3.1.2	Bestimmung der Bakterienzahl.....	33
3.1.3	Kryokonservierung von Bakterien.....	34
3.1.4	Gewinnung von Kulturüberständen	34
3.1.5	Isolierung von <i>E. coli</i> aus dem Darm von Schweinen	34
3.1.6	Mikrointest	35
3.1.7	Motilitätstest.....	36
3.1.8	Nachweis von Curli-Fimbrien.....	36
3.1.9	Hämolyse-Test	36
3.2	Zellbiologische Methoden	36
3.2.1	Standardzellkultur.....	36
3.2.2	Subkultivierung von Zellen	37
3.2.3	Zellzahlbestimmung.....	37
3.2.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	37
3.2.5	Adhäsionstest	38
3.2.6	Infektionstest	38
3.2.7	Wachstumskinetik adhärenter aEPEC an IPEC-J2	40
3.3	Mikroskopische Methoden	40
3.3.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	40
3.3.1.1	Fixierung von Zellen	40
3.3.1.2	Immunohistochemische Färbungen	41
3.3.1.3	FAS-Test	42
3.3.1.4	DNA-Färbung	42
3.3.1.5	Eindecken der Präparate.....	43
3.3.1.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	43
3.3.1.7	Quantitative Auswertung der Mikrokoloniebildung	44
3.3.2	Rasterelektronenmikroskopie	44
3.3.2.1	Konventionelle Rasterelektronenmikroskopie	44
3.3.2.2	Immunogoldmarkierung.....	45
3.4	Molekularbiologische Methoden	45
3.4.1	Isolierung von DNA.....	46
3.4.1.1	Isolierung chromosomaler DNA.....	46
3.4.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA.....	46
3.4.1.3	Isolierung von Cosmid-DNA	47
3.4.2	Aufreinigung von DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion	47
3.4.3	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	47
3.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	48

3.4.5	Agarosegelelektrophorese.....	49
3.4.6	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	50
3.4.6.1	Herstellung elektrokompenter Zellen.....	50
3.4.6.2	Elektroporation	50
3.4.7	Mutagenese nach Datsenko & Wanner.....	51
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	52
3.5.1	Gewinnung sezernierter Proteine von EPEC aus Kulturüberständen	52
3.5.2	Gewinnung von Proteinen aus EPEC-Bakterien	53
3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	54
3.5.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	54
3.5.5	Silberfärbung	55
3.5.6	Westernblot	56
3.5.6.1	Transfer auf eine Nitrozellulosemembran.....	56
3.5.6.2	Immunomarkierung.....	56
3.5.6.3	Enhanced Chemilumineszenz (ECL).....	57
3.6	Statistische Methoden.....	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Auswahl und Charakterisierung der eingesetzten Stämme	59
4.1.1	<i>E. coli</i> Nissle 1917 (EcN).....	59
4.1.2	Vergleichsstämme: SF68, MG1655, IMT13962	61
4.1.3	Adhäsion von EcN und den Vergleichsstämmen an IPEC-J2	62
4.1.4	Porciner aEPEC P2005/03	63
4.2	Effekte von EcN auf die aEPEC-Infektion von IPEC-J2.....	69
4.2.1	Einfluss von EcN auf die aEPEC-Infektionsrate	69
4.2.2	Einfluss von EcN auf Adhäsion, Mikrokoloniebildung und Bildung von A/E- Läsionen durch aEPEC	71
4.3	Charakterisierung des inhibierenden Effektes von EcN auf die aEPEC- Infektion bei Vorinkubation.....	80
4.3.1	Einfluss von EcN auf das Wachstum von aEPEC auf IPEC-J2.....	81
4.3.1.1	Einfluss von EcN auf das Wachstum von aEPEC im Zellkulturüberstand.....	81
4.3.1.2	Einfluss von EcN auf das Wachstum adhärenter aEPEC	83
4.3.1.3	Einfluss der Bildung von Mikrozininen durch EcN auf das Wachstum von aEPEC ..	85
4.3.2	Bedeutung der Fimbrien von EcN für den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion	86
4.3.2.1	Bedeutung der Fimbrien für die Adhäsion von EcN an IPEC-J2	86
4.3.2.2	Bedeutung der durch F1C-Fimbrien vermittelten Adhäsion von EcN für den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion	87

4.3.2.3	Komplementierung eines F1C-negativen <i>E. coli</i> -Stammes mit dem <i>foc</i> -Operon ...	88
4.3.3	Bedeutung der Flagellen von EcN für den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion	92
4.3.3.1	Bedeutung der Flagellen für die Adhäsion von EcN an IPEC-J2	92
4.3.3.2	Einfluss der Flagellenbildung von EcN auf die aEPEC-Infektion.....	96
4.3.4	Einfluss des Kulturüberstandes von EcN auf die aEPEC-Infektion	97
4.3.5	Untersuchungen zur möglichen Ausscheidung eines inhibierend wirkenden Faktors durch EcN mit Hilfe einer <i>aroA</i> -Mutante	99
4.3.6	Einfluss der Adhäsionsstärke von EcN auf die aEPEC-Infektion	101
4.4	Charakterisierung des stimulierenden Effektes von EcN auf die aEPEC-Infektion bei Nachinkubation.....	103
4.5	Einfluss von EcN auf die Sezernierung virulenzassoziierter Proteine durch EPEC	104
5	Diskussion	112
5.1	Inhibierender Effekt von EcN auf die aEPEC-Infektion im IPEC-J2-Modell.....	112
5.2	Adhäsionsfaktoren von EcN und ihre Bedeutung für den inhibierenden Effekt im IPEC-J2-Modell.....	115
5.2.1	Fimbrien und nicht-fimbriale Adhäsine	115
5.2.2	Flagellen	117
5.2.3	Bedeutung der Adhäsion via F1C-Fimbrien und H1-Flagellen für den inhibierenden Effekt von EcN	118
5.3	Diskussion möglicher auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkender Faktoren und Mechanismen von EcN	120
5.3.1	Mikrozine und antagonistisch wirkende Stoffwechselprodukte	120
5.3.2	Kompetitive Exklusion	123
5.3.3	Modulation der epithelialen Barriere- und Abwehrfunktion	127
5.3.4	Einfluss von EcN auf die Sezernierung virulenzassoziierter Proteine durch EPEC	130
5.4	Abhängigkeit des inhibierenden Effektes von der zeitlichen Applikation von EcN im IPEC-J2-Modell	133
5.5	Wirkung des probiotischen <i>E. faecium</i> -Stammes SF68 auf die aEPEC-Infektion im IPEC-J2-Modell	135
	Literaturverzeichnis	139
	Abkürzungsverzeichnis	165
	Abbildungsverzeichnis	167
	Tabellenverzeichnis	169

Danksagung	170
Eidesstattliche Erklärung.....	172

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem in vitro-Modell mit porcinen intestinalen Epithelzellen (IPEC-J2) der Einfluss des probiotischen *E. coli* Nissle 1917 (EcN) auf die Infektion mit atypischen EPEC (aEPEC) untersucht. Es wurde gezeigt, dass EcN bei Vorinkubation auf IPEC-J2 die aEPEC-Infektion in Abhängigkeit von der Dosis drastisch reduzierte. Anhand konfokaler Laserscanningmikroskopie und Elektronenmikroskopie wurde deutlich, dass EcN dabei die Adhäsion und Mikrokoloniebildung inhibierte, jedoch nicht die Ausbildung von *Attaching and Effacing*-Läsionen adhärenter aEPEC beeinflusste. Der inhibierende Effekt von EcN wurde durch dessen sehr gute Adhäsionsfähigkeit an IPEC-J2 vermittelt. Die F1C-Fimbrien wurden als wichtigster Adhäsionsfaktor von EcN identifiziert. Darüber hinaus waren auch H1-Flagellen durch Ausbildung interbakterieller Verbindungen maßgeblich an der Adhäsion des Stammes beteiligt. In gleichem Maß wie die Vorinkubation von EcN reduzierte die Koinkubation seines Kulturüberstandes die aEPEC-Infektion. Das zeigt, dass EcN einen inhibierenden Faktor in den Kulturüberstand abgab. Dieser Faktor wurde auch von anderen pathogenen sowie nicht pathogenen *E. coli*-Stämmen gebildet, ungeachtet ihrer Adhäsionsfähigkeit an IPEC-J2. Der abgegebene Faktor scheint deshalb nicht spezifisch für EcN zu sein. Bei Vorinkubation von Bakterien war deren Adhäsionsfähigkeit grundlegende Voraussetzung für die Inhibierung der aEPEC-Infektion. Zu erklären ist diese Tatsache damit, dass nur adhärente Bakterien auf IPEC-J2 verblieben und den inhibierenden Faktor in ausreichender Konzentration und unmittelbarer Nähe der Wirtszelloberfläche abgeben konnten. Der inhibierende Effekt von EcN auf die aEPEC-Infektion war zudem zeitabhängig. Im Gegensatz zur Vorinkubation erhöhten Ko- und Nachinkubation von EcN die Adhäsion von aEPEC und hatten einen geringeren inhibierenden Effekt auf die Mikrokoloniebildung. Dieser gegensätzliche Effekt auf die Adhäsion von aEPEC wird möglicherweise von einem zweiten Faktor hervorgerufen. Dieser scheint nur dann wirksam zu sein, wenn der inhibierende Faktor in zu geringer Konzentration oder erst nach Adhäsion von aEPEC vorliegt. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die Abgabe eines inhibierenden Faktors durch EcN die initiale Anheftung von aEPEC an die Wirtszelle unterbunden wird. Obwohl der Faktor bisher nicht identifiziert wurde, lassen sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit einige vorher angenommene probiotische Wirkmechanismen von EcN als Ursache für die in vitro beobachtete Inhibierung der aEPEC-Infektion ausschließen wie beispielsweise kompetitive Exklusion, antibakterielle Effekte von Mikrozininen oder Defensinen sowie Stabilisierung der Barrierefunktion der Epithelzellen. Die vorliegende Arbeit gibt erste Hinweise darauf, dass EcN die Expression oder Sezernierung virulenzassoziierten Proteine durch aEPEC inhibieren kann. Das Eingreifen von EcN in einen so essentiellen Schritt des Infektionsprozesses würde einen effektiven Mechanismus gegen aEPEC darstellen.

Schlagworte:

E. coli Nissle 1917, EcN, atypische enteropathogene *E. coli*, aEPEC, Adhäsion, porcine intestinale Epithelzellen, IPEC-J2, Probiotika

Summary

In this study, the effects of the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN) on host cell infection with atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) were investigated in an in vitro porcine intestinal epithelial cell model (IPEC-J2). In pre-incubation experiments, EcN drastically reduced the infection efficiencies of aEPEC in a dose-dependent manner. Using confocal laser scanning microscopy and scanning electron microscopy, it was shown that EcN inhibited the attachment and formation of microcolonies, but not the formation of attaching and effacing lesions by adherent aEPEC. The inhibitory effect was mediated by the adherent properties of EcN to epithelial cells. The F1C fimbriae were identified as the most important adhesion factor of EcN in vitro. Furthermore, the H1 flagellae were also shown to be involved in the adhesion of EcN, serving as bridges between bacterial cells. Co-incubation of culture supernatants of EcN reduced the infection efficiencies of aEPEC to the same extent as in pre-incubation with EcN bacteria, indicating the secretion of an inhibitory factor by EcN. This factor was also secreted by other pathogenic and non-pathogenic *E. coli* strains, regardless of the ability to adhere to IPEC-J2. The secreted component therefore does not appear to be specific for EcN. The inhibitory effect of EcN on aEPEC infection in pre-incubation experiments with bacteria was found to depend on adhesion, due to the fact that only adherent bacteria were able to remain on IPEC-J2 and to secrete sufficient local concentrations of the inhibitory factor at the host cell surface. However, the inhibitory effect of EcN was found to be time-dependent. In contrast to pre-incubation experiments, co- and post-incubation of EcN actually increased the adhesion efficiencies of aEPEC and showed only minor effects on microcolony formation. This second effect of EcN on aEPEC adhesion, possibly due to a second factor, appears only to be effective when the putative inhibitory factor is either present at low concentrations or after aEPEC is already adherent to host cells. The results suggest that EcN interferes with the initial adhesion of aEPEC to host cells by secretion of an inhibitory factor. Although the factor has not yet been identified, the results of this study do not support some of the previously suggested modes of probiotic action discussed for EcN as a mechanism for the observed inhibition of aEPEC infection in vitro, such as competitive exclusion, antibacterial effects of microcins or defensins or stabilization of the barrier function of the intestinal epithelia. Finally, additional results of this study appear to indicate that EcN might inhibit the expression or secretion of virulence-associated proteins by aEPEC. Interference by EcN in this essential step of the infection process could represent a protective mechanism against aEPEC.

Keywords:

E. coli Nissle 1917, EcN, atypical enteropathogenic *E. coli*, aEPEC, adhesion, porcine intestinal epithelial cells, IPEC-J2, probiotics

1 Einleitung

1.1 Intestinale Mikrobiota

Der Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier ist Lebensraum für eine Vielzahl von Mikroorganismen (Bakterien, Protozoen, Pilze). Diese werden unter dem Begriff intestinale Mikrobiota zusammengefasst (Savage, 1999). Den Großteil der intestinalen Mikrobiota stellen Bakterien dar. Im Sinne der Koevolution hat sich hierbei ein Zusammenleben entwickelt, welches sich durch ein komplexes Wirkungsgefüge mit synergistischen und kompetitiven Interaktionen zwischen den einzelnen Bakterienarten untereinander und zu Mensch und Tier auszeichnet (Zoetendal et al., 2004). Die Mehrzahl der im Magen-Darm-Trakt anzutreffenden Bakterienarten kolonisiert diesen dauerhaft und weist stabile Populationen auf. Sie treten nicht nur im Lumen auf, sondern sind meist auch mit der Epithelschicht und dem Mukus assoziiert. Sie werden als indigene oder auch autochthone Arten bezeichnet. Von ihnen zu unterscheiden sind transiente oder auch allochthone Arten, die mit der Nahrung und aus der Umgebung aufgenommen werden, den Darm nicht dauerhaft kolonisieren können und deshalb nur vorübergehend Teil der Mikrobiota sind (Savage, 1977). Unter den indigenen Bakterienarten der Mikrobiota finden sich hauptsächlich kommensale Stämme, die sich vom Nahrungsüberschuss ihres Wirtes ernähren, ihn dabei nicht oder nur unwesentlich schädigen und nicht pathogen sind. Pathogene Bakterien können ebenfalls Teil der indigenen Mikrobiota sein, stellen aber oftmals transiente Bakterienstämme dar (Savage, 1987).

Von zentraler Bedeutung für eine erfolgreiche Kolonisierung des Magen-Darm-Traktes ist die Fähigkeit der Bakterien, an der Darmmukosa zu adhären. Die meisten kommensalen Bakterienstämme können nur so den Darm dauerhaft besiedeln. Für pathogene Stämme stellt die Adhäsion zusätzlich eine wichtige Voraussetzung für die Infektion dar, weil es ihnen erst dadurch möglich ist, mit Hilfe einer Vielzahl von Virulenzfaktoren die zelluläre Barriere zu durchbrechen, Wirtszellfunktionen in den eigenen Dienst zu stellen und für das eigene Wachstum und die Verbreitung auf oder in den Zellen bzw. im Körper auszunutzen (Pizarro-Cerda und Cossart, 2006). Die Adhäsion von Bakterien wird durch so genannte Adhäsine vermittelt. Adhäsine sind Proteine, die entweder an der Spitze fadenförmiger Strukturen auf der Bakterienoberfläche lokalisiert (Fimbrien) oder aber direkt in der Bakterienmembran verankert und zur Oberfläche hin exponiert sind (nicht-fimbriale Adhäsine). Sie binden spezifisch an Rezeptoren der Wirtszelle (Finlay und Caparon, 2000). Als Wirtszellrezeptoren fungieren zumeist Glykoproteine, Glykolipide oder andere Carbohydratverbindungen auf der Apikalseite der Epithelzellmembran (Nhieu und Sansonetti, 2000; Ofek und Doyle, 1994).

Der Interaktion kommensaler Bakterien mit der Darmmukosa kommt eine besondere Bedeutung in der Vermittlung wichtiger physiologischer Funktionen im Darm und der Abwehr von Pathogenen zu. Die Darmmukosa wird zur Luminalseite hin von Epithelzellen und Mukus ausgekleidet. Der Mukus, ein zähflüssiger Schleim aus Glykoproteinen, überzieht die Epithelzellen und schützt diese vor Infektionen, Dehydration, physikalischen oder chemischen Verletzungen und hilft bei der Darmpassage. Epithelzellen und Mukus sind damit ein wichtiger Bestandteil der Barrierefunktion des Darmes gegenüber der Vielzahl der mit der Nahrung und aus der Umgebung aufgenommenen pathogenen Mikroorganismen und Fremdstoffe (mukosale Barriere) (Kelly und King, 2001; Salyers, 2006). Durch die Interaktion der Mikrobiota mit der Darmmukosa wird die Erneuerung der Epithelzellschicht (*turnover*) und die Mukusbildung erhöht und damit deren Barrierefunktion aufrechterhalten (Chowdhury et al., 2007; Salyers, 2006).

Eine entscheidende Bedeutung kommt der intestinalen Mikrobiota bei der Entwicklung und Stärkung des darmassoziierten Immunsystems zu (Chowdhury et al., 2007). Versuche mit keimfreien Mäusen zeigten, dass bei Fehlen der Mikrobiota die Entwicklung des Darmimmunsystems gestört ist und die Tiere anfälliger gegenüber Infektionen sind (Cebra, 1999). Die Stimulation und Regulation des Darmimmunsystems unterstützt zudem die Toleranz gegenüber oral aufgenommenen Nahrungsantigenen (Sudo et al., 1997; Tlaskalová-Hogenová et al., 2004). Pathogene Bakterien können weiterhin durch die Adhäsion kommensaler Bakterienstämme an Mukus und Epithelzellen und der damit verbundenen Konkurrenz um Oberflächenrezeptoren zurückgedrängt werden. Man spricht hierbei von kompetitiver Exklusion (Collado et al., 2005; Collado et al., 2007; Mack und Lebel, 2004). Neben der Wechselwirkung der Bakterien mit der Darmmukosa interagieren die Bakterien untereinander ebenfalls durch Konkurrenz um Nährstoffe und durch Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und antagonistisch wirkender Substanzen (z. B. Bakteriozine). Dadurch kann ein Überwuchern des Darmes mit einzelnen Bakterienarten sowie bedingt auch das Wachstum pathogener Bakterienstämme verhindert werden. Dies wird als bakterielle Interferenz bezeichnet (Saarela et al., 2000).

Eine Bedeutung hat die intestinale Mikrobiota darüber hinaus für die Ernährung und das Wachstum des Wirtsorganismus, ein wichtiges Kriterium in der Tierhaltung. So zeigten Bäckhed et al. (2004), dass konventionelle Mäuse gegenüber keimfreien Mäusen trotz geringerer Futteraufnahme 42 % mehr Körperfett bildeten und eine um 27 % höhere metabolische Rate aufwiesen, dieser Unterschied aber aufgehoben wurde, wenn keimfreie Mäuse mit der Mikrobiota des Caecums konventioneller Mäuse kolonisiert wurden. Sowohl die verstärkte Zellerneuerung des Darmepithels und die daraus resultierende verbesserte Resorption von Nährstoffen als auch die Stärkung der Abwehr tragen zur Steigerung von Wachstum und Leistung bei (Chowdhury et al., 2007). Daneben ist die intestinale Mikrobiota

aber auch direkt am Nährstoffumsatz beteiligt, z. B. durch den Aufschluss von für den Wirt nicht oder schwer verdaulicher Nahrungsbestandteile wie Nicht-Stärke-Polysaccharide (Cellulose, Pektin, 1-3,1-4- β -Glukane, Arabinoxylane u.a.) im Dünn- und v. a. im Dickdarm von Monogastriern (Bäckhed et al., 2005; Simon et al., 2004). Noch deutlicher wird dies am Beispiel der mikrobiellen Vergärung im Pansen von Wiederkäuern, bei der ein erheblicher Anteil der genannten pflanzlichen Gerüstsubstanzen vollständig durch die Bakterien abgebaut und durch das Tier verwertet wird (Van Soest, 2004).

Die für den Wirt wichtigen und vorteilhaften Aufgaben kann die indigene Mikrobiota nur erfüllen, wenn sie sich in einem gesunden Gleichgewicht befindet, welches auch als Homöostase oder Eubiose bezeichnet wird. Eine Änderung einzelner Komponenten kann diese Balance empfindlich stören und den Wirt dadurch anfällig gegenüber Infektionen machen (Dysbiose) (Haenel, 1982). Oftmals ist es pathogenen Bakterienstämmen erst bei Zurückdrängung der kommensalen Mikrobiota und massiver Störung des Gleichgewichts möglich, im Darm zu wachsen und Infektionen hervorzurufen (Hopwood und Hampson, 2003; Savage, 1999). Solch eine Instabilität des Gleichgewichts ist z. B. nach einem abrupten Wechsel vom Säugen zur Verabreichung von fester Nahrung oder einer oralen antiinfektiven Therapie zu beobachten, bei denen sich Zusammensetzung und Aktivität der indigenen Mikrobiota drastisch ändern (Beaugerie und Petit, 2004; Hopwood und Hampson, 2003). Die Pathogenität von Bakterien hängt aber nicht nur vom umgebenden Milieu im Darm ab, sondern insbesondere auch vom Vorhandensein von Virulenzgenen, deren Expression und der entsprechenden Empfänglichkeit des Wirtes (Cossart et al., 2000; Köhler et al., 2001).

Im Allgemeinen ist die Besiedlung des Magen-Darm-Traktes durch Bakterien sowie deren Populationsdichte und Diversität von verschiedenen Faktoren abhängig. Die Erstbesiedlung findet bereits während und unmittelbar nach der Geburt durch Bakterien des Geburtskanals und der Umgebung statt (Penders et al., 2006; Smith, 1965). Danach entwickelt sich die Mikrobiota von einer einfachen, instabilen zu einer komplexen und stabilen Gemeinschaft (Berg, 1996; Konstantinov et al., 2006; Mackie et al., 1999). Dieser Prozess wird v. a. von Nahrung und Umweltfaktoren sowie von Spezies, Alter und individuellen Gegebenheiten des Wirtes beeinflusst (Holdeman et al., 1976; Konstantinov et al., 2004; Mackie et al., 1999; Tannock, 1995; Zoetendal et al., 2002).

Am Beispiel des Schweines zeigt sich, welche erstaunliche Diversität die intestinale Mikrobiota aufweist. Leser et al. (2002) identifizierten mit Hilfe von 16S-rDNA-Analysen im Lumeninhalt von Ileum, Caecum und Colon 12 bis 18 Wochen alter Schweine 375 Phylotypen. Genaue Rückschlüsse auf die tatsächliche Artenanzahl erscheinen schwierig, da anhand der Phylotypen keine Unterscheidung zwischen eng verwandten Arten vorgenommen werden kann. Sie wird wie beim Menschen auf mind. 400 geschätzt (Eckburg

et al., 2005; Moore und Holdeman, 1974). 16S-rDNA-Analysen als kulturunabhängige Nachweisverfahren zeigten weiterhin, dass über die Hälfte der Arten mit herkömmlichen Methoden nicht kultivierbar und bisher nicht identifiziert ist. Trotz der hohen Diversität stellen nur wenige dominante Arten den größten Teil der Populationsdichte. Die Mehrzahl der Bakterienarten im Magen-Darm-Trakt des Schweines nehmen einzeln betrachtet nicht einmal 0,1 % der Gesamtpopulation ein (Hill et al., 2002; Leser et al., 2002). Die Tiere zeigen individuelle Unterschiede in der Artenzusammensetzung der Mikrobiota sowie ihrer Populationsdichte (Katouli et al., 1997).

Die Mikrobiota im adulten Schwein setzt sich zu ca. 90 % aus grampositiven Bakterienspezies zusammen. Es überwiegen die Gattungen *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium* und *Peptostreptococcus*. Die in deutlich geringerer Zahl vorkommenden gramnegativen Bakterien werden von den Gattungen *Bacteriodes* und *Prevotella* dominiert (Konstantinov et al., 2004; Leser et al., 2002; Russel, 1979; Salanitro et al., 1977). Entlang der verschiedenen Abschnitte des Magen-Darm-Traktes zeigt sich ein charakteristischer Anstieg der Populationsdichte, der Artenverteilung und der Diversität vom Magen zum Dickdarm hin. Während im Magen und proximalem Dünndarm aufgrund des niedrigen pH-Wertes und der schnellen Durchflussrate eine relativ niedrige Mikrobenanzahl zu finden ist (10^7 - 10^9 /g Lumeninhalt) (Jensen und Jørgensen, 1994), steigt mit Erhöhung des pH-Wertes sowie Verringerung von Redoxpotential und Durchflussrate die Populationsdichte bis zum Dickdarm (Colon) deutlich an (10^{10} - 10^{11} /g Lumeninhalt) (Chowdhury et al., 2007; Jensen und Jørgensen, 1994; Russel, 1979). Der Dickdarm ist Hauptort der mikrobiellen Besiedlung. Während im Ileum und Colon v. a. säureempfindliche und strikt anaerobe Arten dominieren, wird der Magen und der proximale Dünndarm in erster Linie von säuretoleranten Arten der Gattungen *Lactobacillus* und *Streptococcus* besiedelt (Berg, 1996; Leser et al., 2002; Russel, 1979). Im Colon wird eine signifikant höhere Artenanzahl als im Ileum verzeichnet (Konstantinov et al., 2006). Aber auch innerhalb eines Darmabschnittes weisen so genannte Mikrohabitate wie intestinales Lumen, Epithelzelloberfläche der Zotten oder Krypten und epithelassoziierter Mukus Abweichungen in Populationsdichte und Diversität der Mikrobiota auf (Russel, 1979). Der Einfluss der Nahrung auf die Zusammensetzung der Mikrobiota zeigt sich beispielsweise bei der Nahrungsumstellung in Abhängigkeit des Alters der Schweine. So erfolgt die Erstbesiedlung nach der Geburt v. a. durch *E. coli*, *Clostridium* und *Streptococcus*. Mit dem Säugen und Abfall des pH-Wertes im Magen werden diese Arten bzw. Gattungen innerhalb von 1 bis 2 Tagen in erster Linie durch *Lactobacillus*- und *Bifidobacillus*-Arten verdrängt. Nach dem Säugen und mit Aufnahme fester Nahrung vollzieht sich dann ein drastischer Wechsel hin zu den genannten obligat anaeroben Bakterienarten (Berg, 1996; Konstantinov et al., 2004; Simpson et al., 1999; Smith, 1965; Swords et al., 1993). Aber auch die Zusammensetzung des Futters kann das Auftreten bestimmter Arten

bzw. deren Stoffwechselaktivität beeinflussen. So begünstigt faserreiches Futter mit einem hohen Anteil an Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) insbesondere solche Arten der Gattungen *Enterococcus*, *Bacteriodes*, *Streptococcus*, *Clostridium* und *Ruminococcus*, die über entsprechende Enzyme zum Abbau der NSP verfügen (Beckmann et al., 2006; Leser et al., 2000; Moore et al., 1987; Varel und Yen, 1997). Der Zusatz des NSP-degradierenden Enzyms Xylanase wiederum fördert das Wachstum bestimmter *Lactobacillus*-Arten (*L. reuteri*, *L. acidophilus*) und deren Stoffwechselaktivität im mittleren und hinteren Jejunum und resultiert vermutlich aufgrund bakterieller Interferenz in einer Abnahme der Gesamtzahl an *Enterococcus* sp., *E. coli* und *Shigella* sp. (Hirsch, 2005; Hirsch et al., 2006).

1.2 *Escherichia coli*

Die Bakterienart *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde erstmals 1885 von Theodor Escherich als *Bacterium coli commune* aus den Fäzes des Menschen isoliert (Escherich, 1885) und 1919 ihm zu Ehren in *E. coli* umbenannt (Castellani und Chalmers, 1919). Inzwischen stellt *E. coli* den biochemisch, physiologisch und genetisch am besten charakterisierten Organismus dar, denn *E. coli*-K-12-Stämme werden seit vielen Jahrzehnten als Modellorganismus für die mikrobiologische Forschung eingesetzt (Welch, 2006). Taxonomisch wird *E. coli* dem Phylum *Proteobacteria*, der Klasse *Gammaproteobacteria*, der Ordnung *Enterobacteriales* und der Familie *Enterobacteriaceae* zugeordnet (Garrrity, 2005). Es handelt sich um ein gramnegatives, nicht sporenbildendes, peritrich begeißeltes, fakultativ anaerobes Stäbchen, welches einen Durchmesser von ca. 0,5 µm und eine Länge von 1 bis 3 µm aufweist (Welch, 2006).

E. coli ist Bestandteil der indigenen Mikrobiota im Darm von Mensch und Tier, welcher zugleich das hauptsächliche Habitat für diese Art darstellt. Im Schwein stellt *E. coli* mit 0,7 bis 1,7 %, ähnlich wie in anderen Säugetierspezies, nur einen relativ geringen Anteil an der bakteriellen Gesamtpopulation (Moore et al., 1987; Robinson et al., 1981; Salanitro et al., 1977). *E. coli* besiedelt vornehmlich den Dickdarm (Colon), aber auch den Dünndarm (Jejunum, Ileum) (Dixit et al., 2004). Hinton et al. (1985) wiesen im Schwein zu einem Zeitpunkt bis zu 25 verschiedene *E. coli*-Klone im Darm eines Tieres nach. Schierack et al. (2008) konnten aus den Fäzes einer Sau innerhalb von 4 Wochen 34 verschiedene *E. coli*-Klone isolieren. Über einen Zeitraum von 8 Wochen wurden von dieser Sau (Fäzes, Zitze), ihren 5 Ferkeln (Fäzes) sowie dem Stallboden insgesamt sogar 68 verschiedene *E. coli*-Klone isoliert. Die Untersuchungen belegen, dass die Mehrzahl der *E. coli*-Klone als sogenannte Minor-Klone in nur sehr geringer Zahl auftreten. Von den 68 *E. coli*-Klonen wurden gerade einmal 6 Klone durchgehend über den gesamten Zeitraum nachgewiesen. 27 % der in den Ferkeln nachgewiesenen Klone stellten dominante Klone dar (Anteil an

E. coli-Kolonien $\geq 50\%$), 43 % Minor-Klone (Anteil an *E. coli*-Kolonien $\leq 10\%$). Aus der Sau konnte hingegen kein dominanter Klon isoliert werden, jedoch waren 60 % Minor-Klone. Die Mehrzahl der Klone sowohl von der Sau als auch von den Ferkeln konnte während des Untersuchungszeitraumes nur einmal nachgewiesen werden (82 % bzw. 86 %). Die Zusammensetzung der *E. coli*-Population eines Tieres unterliegt damit einer starken zeitlichen Fluktuation. Dieses wurde zuvor auch schon von Katouli et al. (1995) nachgewiesen. Vorherige Untersuchungen von Schierack et al. (2007) zeigten zudem, dass die Diversität von *E. coli* (D_i : Diversitätsindex nach Simpson; (Hunter und Gaston, 1988)) im Colon ($D_i=0,61$) etwas höher als im Jejunum ($D_i=0,39$) ist. Im Jejunum nachgewiesene Klone traten dabei auch immer im Colon auf. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen der an der Darmmukosa adhären und der nicht adhären Population. Das Auftreten und die Diversität von *E. coli* waren jedoch auch hier individuell (Schierack et al., 2007).

Die meisten der im Darm vorkommenden *E. coli*-Stämme sind kommensale Stämme (Dixit et al., 2004; Selander et al., 1987). Daneben gibt es jedoch eine Reihe von pathogenen *E. coli*-Stämmen, die in Säugern harmlose bis lebensbedrohliche Durchfallerkrankungen, Infektionen des Urogenitaltraktes, Septikämien oder Meningitiden hervorrufen (Donnenberg, 2002). Beim Schwein und Rind kommt *E. coli* zusätzlich eine Bedeutung als Mastitiserreger zu (Bradley, 2002; Fairbrother und Gyles, 2006). Durchfall verursachende *E. coli*-Stämme werden als intestinal pathogen bezeichnet, *E. coli*-Stämme, welche Infektionen außerhalb des Magen-Darm-Traktes verursachen, als extraintestinal pathogen. In Abhängigkeit vom Vorhandensein bestimmter Virulenzmerkmale und dem Auftreten charakteristischer krankhafter Veränderungen in der Wirtszelle bzw. im Wirt werden sie in verschiedene Pathotypen unterteilt. Zu den intestinal pathogenen *E. coli* zählen demnach enteropathogene *E. coli* (EPEC), enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC), enterotoxische *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC) und diffus adhären *E. coli* (DAEC). Extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) umfassen uropathogene *E. coli* (UPEC), Neugeborenen-Meningitis verursachende *E. coli* (NMEC) sowie aviäre pathogene *E. coli* (APEC) (Ewers et al., 2003; Kaper et al., 2004; Nataro und Kaper, 1998).

1.3 Enteropathogene *E. coli* (EPEC)

1.3.1 Bedeutung und Pathogenese

Enteropathogene *E. coli* (EPEC) sind bei Mensch und Tier gleichermaßen wichtige Erreger von akuten Durchfallerkrankungen. EPEC-Infektionen des Menschen betreffen in erster Linie Säuglinge und Kleinkinder in Entwicklungsländern und gehen dort mit einer hohen Mortalität einher (Clarke, 2001; Nataro und Kaper, 1998). Bei Schweinen sind EPEC neben ETEC

Hauptverursacher wässriger Durchfälle bei Absetzferkeln (*Postweaning Diarrhoe*, PWD) (Bertschinger und Fairbrother, 1999; Zhu et al., 1994). Diese sind in der Phase nach dem meist frühen Absetzen (21-28 Tage nach der Geburt) durch die Nahrungsumstellung, der damit verbundenen Änderung der Mikrobiota sowie weiteren Stressfaktoren wie Transport und Umstallung besonders anfällig für intestinale Infektionen (Hopwood und Hampson, 2003).

Ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal von EPEC ist die Bildung sogenannter *Attaching and Effacing*-Läsionen (A/E-Läsionen) am Epithel des Darmes, v. a. im Jejunum und Ileum (Moon et al., 1983). Neben EPEC induzieren auch EHEC (Yu und Kaper, 1992), *Citrobacter rodentium* (Schauer und Falkow, 1993) und *Escherichia alvei* (Albert et al., 1992) diese charakteristischen histopathologischen Veränderungen. Die Bakterien binden dabei sehr eng an die Epithelzelloberfläche, bleiben aber extrazellulär. Das Wirtszytoskelett erfährt eine massive Reorganisation, die zur Bildung podestartiger Strukturen unterhalb der Anheftungsstelle der Bakterien führt. Die Pathogenese ist weiter gekennzeichnet durch Auflösung der Tight junctions und Zerstörung der Barrierefunktion des Darmepithels sowie der Bürstensaummikrovilli. Der Verlust der resorptiven Oberflächen im Darm ruft letztendlich die Durchfallerkrankung hervor (Donnenberg et al., 1997; Nataro und Kaper, 1998).

Typische EPEC-Stämme (EPEC) besitzen ein ca. 69 kb großes Virulenzplasmid, das EAF-Plasmid (*EPEC Adherence Factor Plasmid*) (Tobe et al., 1999), welches unter anderem für Typ IV-Fimbrien, die sogenannten *Bundle Forming Pili* (BFP), kodiert (Girón et al., 1991). BFP vermitteln dabei die Adhäsion der Bakterien untereinander und an die Epithelzellen. Diese Stämme zeigen in vitro auf intestinalen Epithelzellen innerhalb von 3 h ein typisches Adhäsionsmuster mit lokal begrenzter Bildung kompakter Mikrokolonien (*Localized Adherence* (LA) *Pattern*) (Donnenberg et al., 1992). Atypische EPEC-Stämme (aEPEC), denen das EAF-Plasmid fehlt, zeigen häufig ebenfalls lokal begrenzte Mikrokoloniebildung. Die Mikrokolonien sind jedoch weniger kompakt (*Localized Adherence-like* (LAL) *Pattern*) (Trabulsi et al., 2002). Hernandez et al. (2006) konnten zeigen, dass einige aEPEC-Stämme bei längerer Infektion (6 h) ebenfalls das LA-Adhäsionsmuster ausbilden. Daneben adhären einige aEPEC-Stämme diffus ohne Mikrokoloniebildung auf der Epithelzelloberfläche (*Diffus Adherence* (DA) *Pattern*). Diese Form der Adhäsion wird durch ein nicht fimbriales Adhäsion vermittelt, welches durch den *Locus of Diffus Adherence* (LDA) kodiert wird (Scaletsky et al., 2005).

Aus Tieren werden in erster Linie aEPEC-Stämme isoliert. Zhu et al. (1994) konnten in an PWD erkrankten Absetzferkeln in Kanada gehäuft aEPEC-Stämme des Serotyps O45 nachweisen. In Deutschland und Ungarn dominierten darüber hinaus porcine aEPEC-Stämme der Serotypen O123:H11 und O108:H9 (Krause et al., 2005; Malik et al., 2006). Untersuchungen von Krause et al. (2005) und Aktan et al. (2004) zeigten, dass die meisten

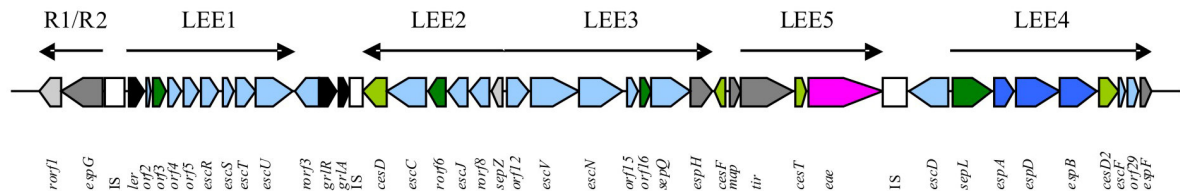
der nachgewiesenen Serotypen jeweils mit bestimmten Tierspezies assoziiert sind, was auf eine Wirtsspezifität vieler aEPEC-Stämme hindeutet. Daneben wurden aber aus Rind, Schaf und Schwein auch einige Stämme solcher Serotypen isoliert, denen humanpathogene aEPEC-Stämme zugeordnet werden (Krause et al., 2005). Dies könnte auf ein mögliches zoonotisches Potential von aEPEC-Stämmen hinweisen. Das Wissen darum ist von besonderem Interesse in Industrieländern, da hier Infektionen mit aEPEC-Stämmen auch beim Menschen dominieren (Trabulsi et al., 2002).

1.3.2 *Locus of Enterocyte Effacement (LEE)*










Die Mehrzahl der an der Bildung von A/E-Läsionen beteiligten Gene sind auf einer chromosomalen Pathogenitätsinsel (PAI), dem sogenannten *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE), lokalisiert (Elliott et al., 1998; McDaniel et al., 1995). Der LEE variiert in A/E-positiven pathogenen Bakterien hinsichtlich seiner Größe und Zusammensetzung, weist aber immer eine ca. 34 kb-große, hoch konservierte Kernregion auf (Deng et al., 2001; Elliott et al., 1998; Gärtner und Schmidt, 2004; Jores et al., 2005; Perna et al., 1998; Zhu et al., 2001). Der Insertionsort des LEE in das bakterielle Genom gibt Aufschluss auf die klonale Abstammung von EPEC und EHEC-Stämmen. Nach dem derzeitigen Modell geht man davon aus, dass der LEE unabhängig von einander in die t-RNA-Gene *selC* und *pheU* insertiert wurde (McDaniel et al., 1995; Sperandio et al., 1998; Wieler et al., 1997) und sich die klonalen Linien durch Aquirierung weiterer Virulenzmerkmale nochmals unterteilten (EPEC1 und EHEC1, *selC*; EPEC2 und EHEC2, *pheU*) (Donnenberg und Whittam, 2001; Jores et al., 2004; Wieler et al., 1997). Sperandio et al. (1998) wiesen zudem auf einen weiteren Insertionsort hin, der durch Rumer et al. (2003) als *pheV* identifiziert wurde. Hierbei scheint der LEE ursprünglich in *pheU* insertiert, aber durch ortsspezifische Rekombination innerhalb des Chromosoms in *pheV* verschoben worden zu sein (Rumer et al., 2003).

Die Kernregion des LEE umfasst 41 offene Leserahmen (ORFs), die in 5 großen polycistronischen Operonen (LEE1, LEE2, LEE3, LEE5, LEE4) und weiteren kleinen Operonen angeordnet sind. Eine Übersicht hierzu gibt Abb. 1, die in Anlehnung an Dean et al. (2005) erstellt wurde. Funktionell ist der LEE in 3 Regionen zu unterteilen: (1) LEE1 bis LEE3, (2) LEE5 und (3) LEE4 (Elliott et al., 1998). LEE1 bis LEE3 beinhalten Gene, die für den globalen Transkriptionsregulator der LEE-Gene, Ler (*LEE encoded regulator*) (Elliott et al., 2000), und für ein Typ 3-Sekretionssystem (T3SS) kodieren (Jarvis et al., 1995). LEE 5 umfasst das Gen *tir* für den translozierten Intiminrezeptor Tir (Kenny et al., 1997) sowie das Gen *eae* (*E. coli attaching and effacing*) für das 94 kDa große, äußere Membranprotein Intimin, welches als Adhäsion fungiert (Jerse et al., 1990). Innerhalb der LEE 4-Region befinden sich die Gene für sezernierte Proteine, welche die Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle erlauben und/oder selbst als Effektorproteine transloziert

werden (Elliott et al., 1998). Daneben kodieren kleinere Operone beispielsweise für zwei weitere Regulatoren, GrlA (*Global regulator for LEE activator*) und GrlR (*Grl repressor*), sowie für weitere Effektorproteine und Chaperone (Deng et al., 2004).



Funktionen der Genprodukte:

	Transkriptionsregulator		Adhäsine Intimin		T3SS-Komponenten
	Translokator		Chaperon		unbekannt
	Effektor		Sezernierung von Translokatoren		Insertionssequenz (IS)

Abkürzungen:

ces: chaperon *E.coli* secretion
eae: *E. coli* attaching and effacing
esc: *E.coli* secretion
esp: *E.coli* secreted protein
grl: global regulator for LEE

ler: LEE encoded regulator
map: mitochondria-associated protein gene
orf/ror: open reading frame/right open reading frame
sep: secretion of *E.coli* protein
tir: translocated intimin receptor gene

Abb. 1: Schematische Darstellung des LEE nach Dean et al. (2005)

1.3.3 Typ 3-Sekretionssystem (T3SS)

Das auf dem LEE kodierte Typ 3-Sekretionssystem (T3SS) kommt hoch konserviert auch in anderen enteropathogenen Bakterien wie zum Beispiel *Salmonella* sp., *Yersinia* sp., *Shigella* sp. und *Chlamydia* sp. vor und weist große Homologien zu Komponenten von Flagellen auf (Hueck, 1998). Das T3SS ermöglicht es den Bakterien, virulenzassoziierte Effektorproteine aus der Bakterienzelle direkt ins Zytosol der Wirtszelle zu translozieren und ist essentiell für die Virulenz der Pathogene (Cossart et al., 2000). In EPEC und EHEC konnten bisher nicht alle der zum Aufbau des T3SS notwendigen Proteine hinsichtlich ihrer Funktion beschrieben werden. Pallen et al. (2005) gelang es jedoch mit Hilfe genetischer Analysen, Homologien zum besser charakterisierten T3SS des Ysc-Yop-Plasmids in *Yersinia* sp. zu identifizieren und wahrscheinliche Funktionen dieser Proteine im LEE-T3SS aufzudecken. Das von den Autoren vorgeschlagene Modell des LEE-T3SS ist in Abb. 2 dargestellt.

Die Kernkomponenten des T3SS sind ein transmembranständiger Basalkörper mit zentraler Pore und eine nadelförmige Struktur. Am Aufbau des Basalkörpers mit innerem und äußerem Ring sind mindestens 11 Proteine beteiligt (Pallen et al., 2005). EscV (Esc: *E. coli* secretion) bildet dabei die Hauptkomponente des inneren Ringes (Gauthier et al., 2003). Daneben sind EscR, EscS, EscT, EscU, EscV und SepZ (Sep: *Secretion of E. coli* protein)

als Untereinheiten an der Bildung und Verankerung des Basalkörpers in der Zytoplasmamembran beteiligt. Innerhalb des inneren Ringes bilden EscJ und SepQ nochmals ringförmige Strukturen aus. EscJ interagiert dabei mit EscD, welches vermutlich den eigentlichen periplasmatischen Kanal zur Verbindung des inneren und äußeren Ringes des Basalkörpers bildet (Crepin et al., 2005; Garmendia et al., 2005; Pallen et al., 2005). EscC ist Hauptbestandteil des Basalkörperringes in der äußeren Membran (Jarvis et al., 1995).

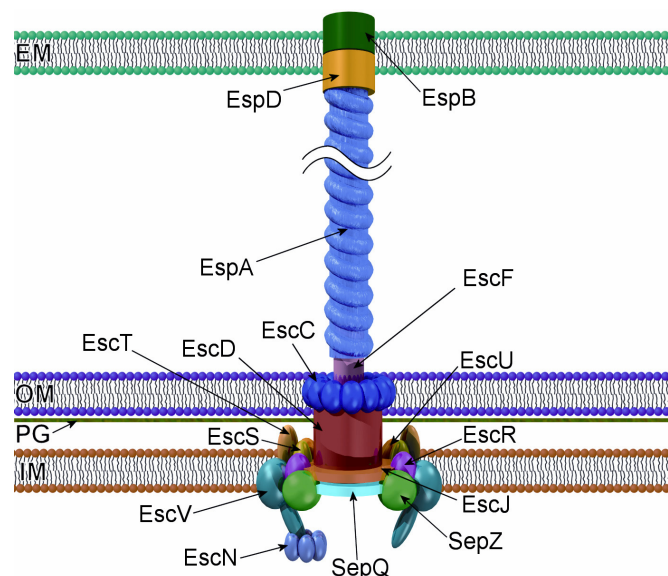


Abb. 2: Schematische Darstellung des LEE-kodierten T3SS

Esc: *E. coli* secretion, Sep: Secretion of *E. coli* protein, Esp: *E. coli* secreted protein, IM: innere Membran, PG: Peptidoglykanschicht, OM: äußere Membran, EM: eukaryotische Membran; entnommen aus Pallen et al. (2005)

Dem äußeren Basalkörperring sitzt die nadelförmige Struktur auf, welche von EscF geformt wird (Wilson et al., 2001). Auf der Spitze dieser „Nadel“ bindet das sezernierte Protein EspA (Esp: *E. coli* secreted protein), welches durch Polymerisation röhrenförmige, filamentöse, flagellenähnliche Strukturen ausbildet (Knutton et al., 1998). Über sie werden zunächst die Proteine EspB und EspD zur Wirtszelloberfläche hin sezerniert, wo sie in die Zellmembran integrieren und Poren formen. Die EspA-Filamente binden dabei weiter an den EspD/EspB-Komplex, wodurch die direkte Translokation von Effektorproteinen aus der Bakterienzelle in das Zytosol der Wirtszelle ermöglicht wird (Ide et al., 2001).

1.3.4 Effektorproteine

Als Effektorproteine werden solche Proteine bezeichnet, die nach Translokation in die Wirtszelle spezifisch an Wirtszellkomponenten binden und über Signaltransduktionswege

gezielt Strukturen und Funktionen der Zelle verändern, um die Kolonisierung der Zelle durch das Pathogen zu ermöglichen. Gleichzeitig wird die zelluläre Abwehr unterdrückt oder umgangen. Über das T3SS der EPEC werden verschiedene Effektor- und Chaperonproteine sezerniert, die die Ausbildung von A/E-Läsionen induzieren, die Barrierefunktion der Zelle zerstören oder aber Abwehrfunktionen der Zelle modulieren (Jarvis et al., 1995; Nataro und Kaper, 1998).

Direkt mit der Bildung der A/E-Läsionen assoziiert sind die beiden Effektorproteine Tir und EspB. Tir wird nach der Translokation ins Zytosol der Wirtszelle in die Zellmembran integriert und dient als Rezeptor für Intimin. Die Tir-Intimin-Interaktion vermittelt die enge Bindung der Bakterien an die Wirtszelle. Darüber hinaus erfolgt die Induzierung von Wirtszellsignalwegen zur Bildung der podestartigen Strukturen (Kenny et al., 1997). Tir weist dabei zwei transmembranständige Domänen auf. Sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich des Proteins ragen ins Zytosol der Wirtszelle hinein, wodurch das Protein eine haarnadelähnliche Form erhält. Eine 109 Aminosäuren lange Sequenz im inneren Bereich des Proteins ragt bogenförmig zur extrazellulären Seite hin aus der Membran heraus und stellt die Bindungsstelle für Intimin dar (de Grado et al., 1999; Kenny, 1999; Kenny et al., 1997). EspB hat nicht nur, wie bereits erwähnt, eine Translokatorfunktion als Bestandteil des EspD/EspB-Membranporenkomplexes (1.3.3), sondern wird auch ins Zytosol der Wirtszelle transloziert. Hier bindet es an Myosin, welches in der Zelle normalerweise mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts interagiert und unter anderem die Bildung der Mikrovilli sowie die Phagozytose vermittelt. Durch Bindung von EspB werden diese Funktionen inhibiert. Als Folge werden die Mikrovilli zerstört (*Effacement*) und die Phagozytose gehemmt (Iizumi et al., 2007).

Neben Tir und EspB werden weitere, nicht in die Bildung der A/E-Läsionen involvierte Effektorproteine transloziert. So dringt das mitochondrienassoziierte Protein Map durch Zerstörung des Membranpotentials in die Mitochondrien ein und verändert deren Morphologie, ohne Apoptose zu induzieren (Kenny und Jepson, 2000). Darüber hinaus induziert Map zu einem frühen Zeitpunkt die Bildung von Filopodien und kann die durch Tir induzierte Podestbildung hemmen (Kenny et al., 2002). Papatheodorou et al. (2006) vermuten, dass die Verlagerung von Map in die Mitochondrien einen effektiven Mechanismus darstellt, um Map aus dem Zytosol zu entfernen und so dessen gegensätzliche Wirkung gegenüber den anderen Effektorproteinen aufzuheben. Gleichzeitig würde es die Kontrolle der von Mitochondrien regulierten Zellprozesse erlauben. Unabhängig von diesen beiden Funktionen ist Map, wie auch EspF, im Zusammenspiel mit Intimin an der Zerstörung der Barrierefunktion des Epithels durch Auflösung der Tight junctions beteiligt (Dean und Kenny, 2004; McNamara et al., 2001). Ein weiteres Effektorprotein, EspG, verändert die parazelluläre Permeabilität des Epithels, ohne in die Zerstörung der Mikrovilli involviert zu sein. EspG bzw. sein Homolog EspG2 interagiert dabei mit Tubulin und führt

damit lokal zur Depolymerisation der Mikrotubuli und Bildung sogenannter *Actin stress fibers* (Hardwidge et al., 2005).

Es wird vermutet, dass die Translokation der Effektorproteine hierarchisch erfolgt. Eine zentrale Rolle scheint dabei dem Chaperon CesT zuzukommen. Elliott et al. (1999) wiesen nach, dass CesT im Zytosol der Bakterienzelle an Tir bindet, Tir dadurch stabilisiert und dessen Sezernierung beschleunigt wird. Tir scheint aber auch unabhängig von CesT transloziert werden zu können (Crawford und Kaper, 2002). Thomas et al. (2007) konnten zeigen, dass CesT und Tir koordiniert exprimiert werden und CesT assoziiert ist mit dem inneren Ring des T3SS-Basalkörpers. Die Autoren schlussfolgerten, dass diese Interaktion die Sezernierung von Tir effizient unterstützt. Darüber hinaus konnten sie nachweisen, dass CesT an alle bekannten Effektorproteine binden kann. Sie formulierten die These, dass CesT nach Sezernierung von Tir membrangebunden oder zytoplasmatisch an diese Effektoren bindet und ebenfalls deren Sezernierung unterstützt (Thomas et al., 2007).

1.3.5 Podestbildung

Zentrales Element von A/E-Läsionen ist die Reorganisation des Wirtszytoskeletts mit Bildung podestartiger Strukturen unterhalb der Anheftungsstelle der Bakterien. Die Rekrutierung von Zytoskelettproteinen erfolgt dabei über eine Signalkaskade, die durch die Integration von Tir in die Wirtszellmembran und Bindung von Intimin induziert wird (Kenny und Finlay, 1997). Eine schematische Darstellung der wichtigsten beteiligten Komponenten der Podestbildung gibt Abb. 3 wieder (Bhavsar et al., 2007).

Nachdem Tir in die Wirtszelle transloziert wurde, erfolgt die Phosphorylierung von Tyrosin an Position 474 in der C-terminalen Domäne von Tir durch verschiedene eukaryotische Proteinkinasen (Fyn, Arg, Abl) (Kenny, 1999; Phillips et al., 2004; Swimm et al., 2004). Dies ermöglicht die direkte Bindung des eukaryotischen Adaptorproteins Nck (*non-catalytic region of tyrosine kinase*) an Tir. Nck aktiviert nachfolgend N-WASP (*neutral Wiskott-Aldrich syndrome protein*) und N-WASP den Arp2/3-Komplex (*actin-regulatory proteins*), was zur Polymerisation von Aktin und zur Podestbildung führt (Gruenheid et al., 2001). EHEC, deren Tir im Gegensatz zu EPEC in der Aminosäuresequenz an Stelle 474 nicht Tyrosin, sondern Serin aufweist, nutzt zur Aktivierung von N-WASP nicht Nck, sondern das auf einem Prophagen kodierte Effektorprotein TccP (*Tir-cytoskeleton coupling protein*; Synonym: EspF_U) (Garmendia et al., 2004). Die Rekrutierung von TccP und die nachfolgende Nck-unabhängige Aktivierung von N-WASP in EHEC bedingen die Tyrosinphosphorylierung von Tir an Position 458 (Y458) (Brady et al., 2007). Viele EHEC-Stämme weisen auf einem weiteren Prophagen ein *tccP*-Pseudogen auf, *tccp2*, dessen Protein TccP2 ebenfalls die Aktivierung von N-WASP vermittelt (Ogura et al., 2007). Whale et al. (2006) konnten TccP auch in EPEC nachweisen, wobei von den Bakterien simultan sowohl der Nck- als auch der

TccP-vermittelte Weg der N-WASP-Aktivierung genutzt wurde. EPEC-Stämme der klonalen Linie EPEC2 wiesen zudem auch TccP2 auf (Whale et al., 2007). Im Gegensatz zu EHEC wird in EPEC die Aktivierung von N-WASP über TccP/TccP2 durch die Tyrosinphosphorylierung von Tir an Position 454 (Y454) vermittelt (Brady et al., 2007). An der Podestbildung sind neben F-Aktin noch weitere Proteine des Zytoskeletts beteiligt, darunter beispielsweise Cortactin (Cantarelli et al., 2006), Cytokeratin-18 (Batchelor et al., 2004), Dynamin (Unsworth et al., 2007) und das Tight junction-Protein ZO-1 (Hanajima-Ozawa et al., 2007).

Die Podeste stellen keine starren Gebilde dar. Sie sind vielmehr durch eine ständige Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktin gekennzeichnet, was die Variation ihrer Länge und sogar ihre Translokation auf der Wirtszelloberfläche ermöglicht („Flüssiges Modell“) (Shaner et al., 2005). Die Depolymerisation von F-Aktin könnte durch Cofilin, die Polymerisation durch Profilin erfolgen (Goosney et al., 2001; Meberg et al., 1998).

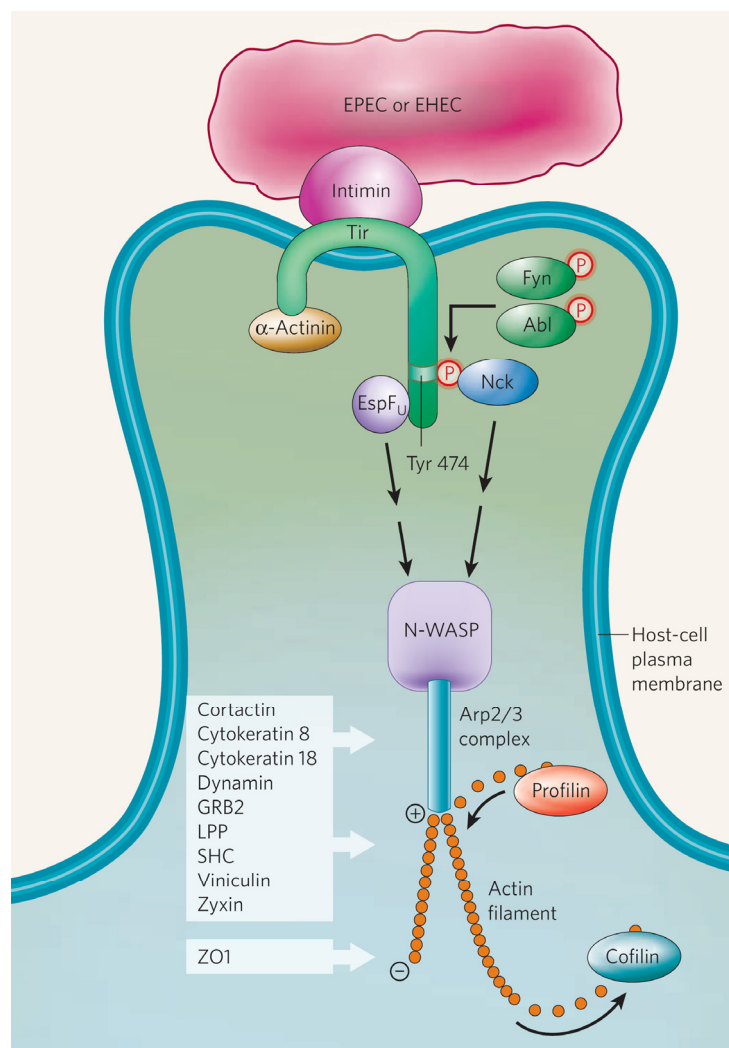


Abb. 3: Schematische Darstellung der Podestbildung durch EPEC nach Bhavsar et al. (2007)

1.3.6 Regulation der Virulenzgenexpression

Die Regulation der LEE-Gene in EPEC stellt einen komplexen Prozess dar und wird bisher trotz Identifizierung zahlreicher involvierter Regulatoren nur unzureichend verstanden. Sie erfolgt als Antwort auf sich ändernde Umweltbedingungen wie Temperatur, pH-Wert, Osmolarität, Wachstumsphase oder eukaryotische Signalmoleküle (Kenny et al., 1997; Sperandio et al., 1999; Umanski et al., 2002). Dem auf dem LEE 1-Operon kodierten Protein Ler kommt dabei eine Schlüsselrolle zu, da es die Transkription fast aller LEE-Gene sowie weiterer außerhalb des LEE kodierter Virulenzgene aktiviert (Elliott et al., 2000). GrlA (*Global regulator for LEE activator*) und GrlR (*Grl repressor*) sind weitere Elemente innerhalb des LEE und regulieren Ler positiv bzw. negativ (Barba et al., 2005; Lio und Syu, 2004). Ler wird darüber hinaus durch globale Regulatoren wie Fis (*Factor for inversion stimulation*) und IHF (*Integration host factor*) sowie durch mit *Quorum sensing* assoziierte Proteine wie QseA (*Quorum sensing E. coli regulator A*) und AI-2 (*Autoinducer 2*) aktiviert (Friedberg et al., 1999; Goldberg et al., 2001; Sperandio et al., 2002; Sperandio et al., 1999). Die DNA-bindenden Proteine Hha (*Haemolysin expression modulating protein*) und H-NS (*Histone-like nucleoid structuring protein*) agieren als Repressoren der Virulenzgene, Hha durch direkte Inhibierung von Ler (Sharma und Zuerner, 2004) und H-NS durch Inhibierung der Transkription des LEE 3- und LEE 4-Operons (Bustamante et al., 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass die ClpXP-Protease durch Repression des Stress-Sigma-Faktors RpoS und GrlR als positiver Regulator der LEE-Gene fungieren (Iyoda und Watanabe, 2005; Tomoyasu et al., 2005). In typischen EPEC-Stämmen werden die LEE-Gene zusätzlich durch den Transkriptionsaktivator Per (*Plasmid encoded regulator*) reguliert, welcher auf dem EAF-Plasmid durch das Gencluster *perABC* kodiert wird. Das Protein PerA aktiviert dabei direkt Ler und über die Transkriptionskaskade via Ler indirekt die anderen LEE-Operone. PerB und PerC verstärken die Aktivität von PerA und wirken so indirekt auf Ler (Gómez-Duarte und Kaper, 1995; Mellies et al., 1999; Tobe et al., 1996). Daneben wird durch PerA auch die Bildung der *Bundle Forming Pili* (BFP) reguliert (Tobe et al., 1996).

1.4 Probiotika

1.4.1 Allgemeine Betrachtungen

Probiotika sind lebende, nicht pathogene Mikroorganismen, die nach Aufnahme durch Mensch oder Tier die Balance der indigenen Mikrobiota stärken und sich positiv auf die Gesundheit und Leistungsfähigkeit auswirken (Fuller, 1989). Die am häufigsten eingesetzten probiotischen Keime sind Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* (Roberfroid, 2000). Aber auch andere Gattungen wie *Enterococcus*, *Escherichia* und *Bacillus*

sowie Hefen der Gattung *Saccharomyces* finden seit einigen Jahren Anwendung als Probiotika (Ouwehand et al., 2002). Neben der überschaubaren Anzahl an Probiotika, die als Nahrungsergänzungsmittel, Futterzusatzstoffe oder Medikamente zugelassen sind, werden unzählige weitere nicht pathogene Stämme hinsichtlich ihrer probiotischen Wirkung untersucht und beschrieben. Dies ist nicht verwunderlich, da Probiotika oft aus Mensch oder Tier isoliert wurden und dementsprechend definitionsgemäß ehemals Teil der kommensalen indigenen Mikrobiota waren. Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, erfüllt die indigene Mikrobiota im Darm wesentliche Aufgaben zur Aufrechterhaltung der Darmfunktionen, darunter die Stabilisierung der mukosalen Barriere (Chowdhury et al., 2007; Salyers, 2006), Entwicklung des darmassoziierten Immunsystems (Cebra, 1999; Chowdhury et al., 2007; Sudo et al., 1997; Tlaskalová-Hogenová et al., 2004), zusätzliche Hemmung pathogener Keime durch bakterielle Interferenz und kompetitive Exklusion (Collado et al., 2005; Collado et al., 2007; Mack und Lebel, 2004; Saarela et al., 2000) sowie Ergänzung des Stoffwechsels durch enzymatischen Aufschluss schwer oder nicht verdaulicher Nährstoffe (Bäckhed et al., 2004; Bäckhed et al., 2005; Simon et al., 2004). Mensch und Tier profitieren durch Erhaltung ihrer Gesundheit und Leistungsfähigkeit. Doch unter den kommensalen Mikroorganismen gibt es große Unterschiede hinsichtlich ihrer nützlichen Wirkung für Mensch und Tier. Nur ein Teil ist in besonderem Maße in der Lage, eine oder mehrere der nützlichen Wirkungen zu vermitteln. Und auch diese unterscheiden sich erheblich in ihrer Wirkungsweise. Diese Organismen werden als Probiotika ausgewählt und gezielt eingesetzt, meist präventiv oder begleitend, immer häufiger aber auch kurativ, um den Organismus zu stärken und unempfindlicher gegenüber Stressoren wie Infektionen werden zu lassen.

Ursprünglich als Nahrungsmittelzusatz für den Menschen konzipiert, werden Probiotika zunehmend auch als Futterzusatzstoffe in der Nutztierhaltung eingesetzt. Sie stellen dabei eine Alternative zu den als Leistungsförderer eingesetzten Antiinfektiva dar, deren Anwendung in der Tierfütterung seit Januar 2006 EU-weit verboten ist. Ein großes Interesse beim Einsatz von Probiotika besteht darin, durch darmpathogene Bakterien ausgelöste Infektionen und den durch sie verursachten Durchfallerkrankungen vorzubeugen und zu behandeln. Untersuchungen aus Dänemark zeigen, dass mit dem Verzicht auf Antiinfektiva in der Fütterung in 10 % bis 15 % der Schweinemastbetriebe Probleme mit Durchfall hervorrufenden *E. coli*-Keimen bei Absetzferkeln auftraten (Wegener, 2003). Demgegenüber stehen Ergebnisse verschiedener Fütterungsversuche beim Schwein, welche belegen, dass Probiotika zur Herabsetzung der Durchfallinzidenz beim Schwein beitragen können (1.4.2).

1.4.2 Wirkung von Probiotika beim Schwein

Unzählige Studien haben sich mit der Wirkung von Probiotika auf den Menschen und auf verschiedenste Tierspezies beschäftigt. Dabei wurden v. a. Erkenntnisse zu Wirkungen auf

das Immunsystem umfassend beschrieben [Reviews: (Boirivant und Strober, 2007; Erickson und Hubbard, 2000; Marteau et al., 2001; Ouwehand et al., 2002; Parkes, 2007)]. Oftmals kann über die zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen aber auch nur spekuliert werden. Im Folgenden werden ausgewählte Untersuchungen beim Schwein vorgestellt mit besonderem Augenmerk auf eine hemmende Wirkung von Probiotika auf pathogene *E. coli*. In Fütterungsversuchen beim Schwein wurde belegt, dass die Gabe von verschiedenen probiotischen Mikroorganismen zur Reduzierung pathogener Keime im Darm beitragen, Durchfallraten senken und Gewichtszunahmen steigern kann. Die Gabe von *Bacillus coagulans* resultierte beispielsweise in einer Verringerung der Anzahl pathogener *Enterococcus* sp. und Coliformen in den Fäzes von Ferkeln (Adami und Cavazzoni, 1999). Der Einsatz von *Lactobacillus* und *Saccharomyces* konnte die Anzahl von *E.coli*-Keimen in den Fäzes von Ferkeln ebenfalls dezimieren (Kovács-Zomborszky et al., 1994). Untersuchungen durch Mack et al. (1999) weisen im Fall von *Lactobacillus* darauf hin, dass die verringerte Adhärenz darmpathogener *E. coli* auf eine verstärkte Expression von Muzinen durch das Epithel zurückzuführen sein könnte. *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus rhamnosus* waren in der Lage, die Adhäsion von EPEC an der humanen intestinalen Epithelzelllinie HT-29 zu unterdrücken. Dabei wurde durch die Inkubation von *Lactobacillus plantarum* die *muc2*- und *muc3*-mRNA-Bildung der Epithelzellen erhöht. Resta-Lenert & Barret (2003) konnten ebenfalls an HT-29-Zellen eine verringerte Adhäsion und Invasion von enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) durch *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus acidophilus* nachweisen. Diese beiden probiotischen Stämme stabilisierten gleichzeitig die Barrierefunktion des Epithels und verhinderten die durch EIEC induzierte Auflösung der Tight junctions und die Erhöhung der Membranpermeabilität. Interessanterweise konnte mit den antibiotisch abgetöteten Stämmen zwar die Adhäsion verringert, nicht aber die Invasion der EIEC verhindert werden. Bei Hitzeinaktivierung zeigten die Stämme keine Wirkung auf EIEC (Resta-Lenert und Barrett, 2003).

Underdahl (1983) untersuchte die Beeinflussung intestinal pathogener *E. coli* durch *Streptococcus faecium*. Auch hier konnte eine verringerte Durchfallrate und eine erhöhte Gewichtszunahme verzeichnet werden. Da die Menge und das Wachstum von *E. coli* nicht beeinflusst wurden, schloss der Autor eine direkte Wirkung des Probiotikums auf die pathogenen Bakterien aus und führte die positiven Effekte vielmehr auf eine Beeinflussung der mukosalen Abwehr zurück.

Der probiotische *Bifidobacterium lactis*-Stamm HN019 konnte die mit Rotavirus und *E. coli*-Infektionen assoziierten Durchfälle während des Absetzens von Ferkeln reduzieren. Dieser Effekt könnte auf eine gesteigerte Immunantwort zurückzuführen sein, da die Blutleukozyten eine gesteigerte Phagozytose und die T-Lymphozyten eine gesteigerte Proliferation

aufwiesen. Außerdem zeigten sich erhöhte pathogenspezifische Antikörpertiter im Blut (Shu et al., 2001).

Gedek et al. (1993) untersuchten den Einfluss von *Bacillus cereus* auf die Anzahl von *E. coli* und *Enterococcus* sp. in den Fäzes von Schweinen und kamen in zwei voneinander unabhängigen Fütterungsversuchen zu gegenteiligen Ergebnissen. In einem wurde eine erhöhte Anzahl, in dem anderen eine verringerte Anzahl an *E. coli* und *Enterococcus* sp. verzeichnet. Kirchgessner et al. (1993) konnten für *Bacillus cereus* gesteigerte Gewichtszunahmen bei Ferkeln nachweisen, die Durchfallrate konnte jedoch nicht gesenkt werden. Sporenpräparate von *Bacillus licheniformis* und *Bacillus cereus* var. Toyoi senkten die durch enterotoxische *E. coli* (ETEC) hervorgerufenen Durchfall- und Sterblichkeitsraten der Ferkel (Kyriakis et al., 1999).

Die Wirkung der probiotischen Stämme *Bacillus cereus* var. Toyoi (NCIMB 40112) und *Enterococcus faecium* SF68 (NCIMB 10415) auf Schweine wurde ebenfalls durch eine DFG-Forscherguppe am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin untersucht, an der auch das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen beteiligt war (FOR 438: „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“). Das Ziel war es, in einem interdisziplinären Ansatz differenziert den Einfluss dieser Probiotika auf Leistungsparameter und Gesundheit von Ferkeln, im Besonderen auf die intestinale Mikrobiota sowie auf die Morphologie, Physiologie und Immunreaktion des Darmes zu beschreiben, um so konkrete Hinweise auf mögliche Wirkungsmechanismen der Probiotika zu erhalten. Die Probiotika wurden Sauen während der Trächtigkeit und Laktation sowie ihren Ferkeln verabreicht. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl durch *E. faecium* SF68 als auch *B. cereus* var. Toyoi die Durchfallrate bei den Ferkeln nach dem Absetzen gesenkt wurde (von 38 % auf 21 % bzw. von 59 % auf 38 %) (Taras et al., 2005; Taras et al., 2006). In beiden Fällen konnte ein Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikrobiota bzw. deren metabolische Aktivität nachgewiesen werden. So erhöhte *B. cereus* var. Toyoi tendentiell den Gehalt an kurzkettigen Fettsäuren im hinteren Jejunum bis Colon und verringerte gleichzeitig den Gehalt an Laktatsäure während des Säugens (Jadamus et al., 2002). *E. faecium* SF68 reduzierte signifikant die Gesamtzahl von *Enterococcus* sp. und *E. faecalis* im Colon von 2 Wochen alten Ferkeln sowie in Jejunum und Colon eine Woche nach dem Absetzen der Ferkel. Die Anzahl von *E. faecium* wurde nicht beeinflusst (Vahjen et al., 2002). Scharek et al. (2005) wiesen in den mit *E. faecium* SF68 gefütterten Tieren eine Reduktion der β -hämolyisierenden *E. coli* und *E. coli* des Serotyps O141 nach. Die Anzahl an anaeroben Bakterien und Coliformen blieb jedoch gleich. Pollmann et al. (2005) zeigten zudem, dass *E. faecium* SF68 die Übertragung von Clamydrien von der Sau auf die Ferkel von 85 % auf 60 % verringerte.

E. faecium SF68 scheint Einfluss auf die Entwicklung der humoralen Immunantwort der Ferkel zu nehmen. Während sich 5 Wochen alte Ferkel der Probiotikagruppe in ihrem Gesamtgehalt an IgG im Serum nicht von denen der Kontrollgruppe unterschieden, wiesen 8 Wochen alte Ferkel der Probiotikagruppe signifikant verringerte IgG-Werte auf. Dabei blieb die Anzahl von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen in den Peyerschen Plaques unverändert, zytotoxische CD8⁺-Zellen im Epithel des Jejunums waren jedoch deutlich reduziert (Scharek et al., 2005). Eine ähnliche Wirkung auf die IgG-Werte nach dem Absetzen hatte auch *B. cereus* var. Toyoi (Scharek et al., 2007). Doch stimulierte dieser probiotische Stamm signifikant die Anzahl CD8⁺-T-Zellen und tendentiell die $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation im Epithel sowie die Anzahl von CD25⁺-Lymphozyten und $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Lamina propria (Scharek et al., 2007). Die verstärkte Immunantwort in Ferkeln gegenüber *B. cereus* var. Toyoi zeigte sich auch im veränderten Proliferationsmuster der Immunzellen im Blut (PBMCs). Bei den Ferkeln der Probiotikagruppe konnten im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe eine geringere Anzahl an CD8(high)/CD3⁺- und CD8(low)/CD3⁺-T-Zellen, aber eine erhöhte Anzahl an CD4⁺/CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden. Nach polyklonaler Stimulation der PBMCs zeigte sich zudem eine verstärkte Produktion der Zytokine IL-4 und IFN- γ . Daneben konnten erhöhte Antikörpertiter gegen H3N2 Influenza- und Mycoplasmen-Antigene nachgewiesen werden (Schierack et al., 2007).

Einen signifikanten Einfluss auf die Leistung der Ferkel durch verbesserte Futterverwertung und tägliche Gewichtszunahme hatte nur *B. cereus* var. Toyoi (Taras et al., 2005; Taras et al., 2006; Taras et al., 2007), obwohl für beide Probiotika ein tendentieller Effekt auf Transportmechanismen im Dünndarm nachgewiesen werden konnte (Erhöhung der Absorptionsrate von Aminosäuren und Glukose, Verringerung der Sekretion), jedoch kein oder nur ein sehr geringer stabilisierender Effekt auf die Barrierefunktion des Epithels (Lodemann et al., 2006; Lorenz, 2006). Am Darmepithel traten dabei aber keine nennenswerten anatomischen Änderungen auf (Zottenhöhe, Kryptentiefe, Oberflächenvergrößerungsfaktor, Proliferationsrate der Epithelzellen, Becherzellenanteil) (Reiter et al., 2006). Auch das Auftreten bestimmter endokriner Zellen (Gastrin-, Somatostatin-, Serotonin-produzierende Zellen) änderte sich nicht und zeigte damit keinen Einfluss der Probiotika auf die funktionelle Differenzierung der verschiedenen Darmabschnitte beim heranwachsenden Tier. Gleichwohl zeigten sich aber tendentiell Änderungen im Enzymmuster der Darmschleimhaut. So reduzierte *E. faecium* SF 68 die Aktivität der alkalischen Phosphatase, *B. cereus* var. Toyoi erhöhte sie (Seelig, 2007).

1.4.3 *E. coli* Nissle 1917 (EcN)

Der probiotische *E. coli*-Stamm Nissle 1917 (EcN) gehört neben einigen probiotischen Laktobazillen und Hefen zu den am besten charakterisierten Probiotika. Der Stamm wurde vom deutschen Arzt Alfred Nissle vermutlich 1915 aus der Stuhlprobe eines Soldaten isoliert, der als einziger von seinen Kameraden während des 2. Balkankrieges nicht an Diarrhö erkrankt war. Schon damals beschäftigte sich Nissle mit dem antagonistischen Verhalten kommensaler *E. coli*-Stämme gegenüber Pathogenen und deren Einsatz in der Bekämpfung von bakteriellen und entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen. Er beschrieb EcN mit Hilfe des „antagonistischen Index“, der ein Maß für die Hemmung von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi auf Agarplatten darstellte, als besonders hemmend. Schon 1916 verwendete A. Nissle EcN als „Probiotikum“ und meldete ein Patent unter dem Namen Mutaflor an (Loew, 2001; Nissle, 1918), das 1917 eingetragen wurde. Bis heute findet der Stamm Anwendung in der Humanmedizin (Mutaflor®) und wird seit einigen Jahren auch als Arzneimittel für Rinder (Ponsocol®) eingesetzt.

EcN weist den Serotyp O6:K5:H1 mit einem semirauen Lipopolysaccharid (LPS) auf (Grozdanov et al., 2002). Er ist der ECOR-Gruppe B2 zuzuordnen, zeigt eine enge phylogenetische Verwandtschaft zum UPEC-Stamm CFT073, ist aber nicht pathogen (Blum et al., 1995; Grozdanov et al., 2004; Sun et al., 2005). Im Gegensatz zu anderen nicht pathogenen *E. coli*-Stämmen wie K-12 besitzt EcN zahlreiche Fitnessfaktoren, darunter die Mikrozyme H47 und M (Patzner et al., 2003) sowie 6 Eisenaufnahmesysteme (Enterobaktin, Yersiniabaktin, Aerobaktin, Salmochelin, ein Citrat- und ein Hämin-abhängiges Eisenaufnahmesystem) (Grozdanov et al., 2004).

In Anwendungsstudien beim Menschen konnte gezeigt werden, dass EcN mit hoher Wirksamkeit (81,1 %) und geringer Anzahl von Verdachtsfällen auf Nebenwirkungen (2,8 %) verschiedenste gastrointestinale Beschwerden, darunter chronisch rezidivierende oder protrahierte Diarrhö, chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Reizdarmsyndrom und chronische Obstipation, mildern kann. Dabei zeigten sich eine Verbesserung in der Stuhlsequenz, Stuhlkonsistenz und verringerte Symptome wie Blähungen und abdominaler Schmerz (Krammer et al., 2006). Auch Kruis et al. (2004) und Schultz et al. (2004) wiesen die Effektivität von EcN in der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und ulzerativer Kolitis beim Menschen nach. Bei Säuglingen und Kleinkindern mit unspezifischer Diarrhö führte die EcN-Behandlung gegenüber der Placebo-Behandlung ebenfalls zur schnelleren Abnahme der Durchfallsymptome (7 Tage: 78,7 % versus 59,2 %, 14 Tage: 93,3 % versus 65,8 %, 21 Tage 98,7 % versus 71,1 %) (Henker et al., 2008).

Die Wirkung von EcN könnte auf drei verschiedene Mechanismen zurückzuführen sein: (1) antiinflammatorische Wirkung, (2) Stabilisierung der Barrierefunktion des Darmepithels und (3) Reduktion pathogener Bakterien. Helwig et al. (2006) wiesen eine antiinflammatorische

Wirkung von EcN im Mensch nach. Dabei induzierte der Stamm die Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch periphere mononukleäre Blutzellen, hatte aber keinen Einfluss auf die Bildung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α . Ein ähnliches Ergebnis mit reduzierten IL-2 und TNF- α -Werten, aber einem erhöhten IL-10-Wert peripherer Blut-T-Zellen des Menschen konnte durch Sturm et al. (2005) gezeigt werden. Im Schwein hatte EcN nur einen geringen Effekt auf die Verteilung mukosaler Immunzellen im Darm gesunder Ferkel (Duncker et al., 2006). Es wird vermutet, dass EcN bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch seine antiinflammatorische Wirkung eine Überreaktion des Immunsystems auf eigentlich harmlose Darmbakterien unterbinden kann (Helwig et al., 2006). In in vivo-Studien in Maus und Schwein schützte EcN zudem vor experimentell induzierter Kolitis. Dieser Effekt ist vermutlich auf die Stabilisierung der Barrierefunktion des Epithels zurückzuführen (Schroeder et al., 2006; Ukena et al., 2007). Darüber hinaus zeigten Boudeau et al. (2003) in vitro an humanen intestinalen Epithelzellen (INT407) einen inhibierenden Effekt auf die Infektion durch adhärent-invasive *E. coli* (EIEC), welche möglicherweise mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert sind. EcN inhibierte auch die Infektion von INT407-Zellen durch andere darmpathogene Bakterien wie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* und *Listeria monocytogenes* (Altenhoefer et al., 2004). In vivo wurde im Schwein eine inhibierende Wirkung auf enterotoxische *E. coli* (ETEC) nachgewiesen. EcN verhinderte hier bei präventiver Applikation die Infektion von Ferkeln mit dem ETEC-Stamm Abbotstown (Schroeder et al., 2006). Dies lässt den Schluss zu, dass der Stamm EcN auch effektiv gegen aEPEC-Infektionen bei Absetzferkeln wirken könnte. Bisher liegen dazu keine in vivo- oder in vitro-Studien vor.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es aufzuzeigen, ob der probiotische *E. coli*-Stamm EcN inhibierend auf die Infektion von intestinalen Epithelzellen durch porcine aEPEC einwirkt. Dazu sollte ein in vitro-Infektionsmodell mit der intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2 vom Schwein genutzt werden. Einen Schwerpunkt der Arbeit stellte die Charakterisierung möglicher, durch den Stamm EcN hervorgerufener Veränderungen in der Interaktion von aEPEC mit den Epithelzellen dar. Im Mittelpunkt sollten dabei mögliche Effekte auf die Infektionsschritte Adhäsion, Mikrokoloniebildung und Ausbildung der *Attaching and Effacing*-Läsionen (A/E-Läsionen) stehen. Es sollte ferner untersucht werden, inwieweit ein möglicher inhibierender Effekt von der zeitlichen Applikation von EcN abhängt. Darüber hinaus sollten weitere *E. coli*-Stämme sowie der probiotische *E. faecium*-Stamm SF68 in ihrer Wirkung auf die aEPEC-Infektion mit der von EcN verglichen werden. Bei einer Inhibierung der aEPEC-Infektion sollte der entsprechende Faktor von EcN näher charakterisiert werden und Hinweise auf mögliche zugrunde liegende Wirkungsmechanismen gegeben werden. Als ein Wirkungsmechanismus von Probiotika wird die Hemmung der Adhäsion und Invasion pathogener Bakterien durch Blockierung von Wirtszellrezeptoren für Adhäsine der Pathogene diskutiert (kompetitive Exklusion). Im Hinblick auf diese These sollte die Bedeutung der von EcN gebildeten Adhäsine für dessen Anheftung an IPEC-J2 und für eine Inhibierung der aEPEC-Infektion aufgeklärt werden.

2 Material

2.1 Zelllinie

Für alle Zellkulturexperimente wurde die Zelllinie IPEC-J2 (*Intestinal Porcine Epithelial Cell – Jejunum 2*) genutzt. Hierbei handelt es sich um eine permanente, nicht transformierte Epithelzelllinie, die aus dem Jejunum eines neugeborenen, nicht gesäugten Ferkels gewonnen wurde. Sie wurde von A. Blikslager (North Carolina State University, Raleigh, USA) zur Verfügung gestellt und von Schierack et al. (2006) charakterisiert und als geeignetes in vitro-Modell für die Untersuchung der Wirt-Pathogen-Interaktion von intestinal pathogenen Bakterien beschrieben.

2.2 Bakterienstämme

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Quelle; Referenz
EcN	<i>E. coli</i> Nissle 1917 (DSM 6601), probiotisch, O6:K5:H1	Mensch	Mutaflor®, Ardeypharm, Herdecke; (Nissle, 1918)
EcN $\Delta aroA$	EcN, Deletion <i>aroA</i> (bp 133-812), Km ^R	Mensch	diese Arbeit
EcN Δfim	EcN, Deletion <i>fim</i> -Operon	Mensch	T. Ölschläger, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg; (Altenhoefer et al., 2004)
EcN $\Delta fimfoc$	EcN, Deletion <i>fim</i> - und <i>foc</i> -Operon	Mensch	T. Ölschläger, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg; (Altenhoefer et al., 2004)
EcN $\Delta fliA$	EcN, Deletion <i>fliA</i> (bp 41-672), Km ^R	Mensch	diese Arbeit
EcN Δfoc	EcN, Deletion <i>foc</i> -Operon	Mensch	T. Ölschläger, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg; (Altenhoefer et al., 2004)
E2348/69	EPEC, O127:H6, NaI ^R	Mensch	J. B. Kaper, University of Maryland, Baltimore, USA
H5316	<i>E. coli</i> K-12 MC4100, Δlac , <i>entC::MudX fur-31zbd::Tn10</i>	Mensch	K. Hantke, Mikrobiologisches Institut, Universität Tübingen; (Patzner et al., 2003)
IMT13962	<i>E. coli</i> O15:n.t., <i>fim</i> ⁺ , <i>foc</i> ⁻ , isoliert von Mukosa, distales Colon, Ferkel 35d alt	Schwein	diese Arbeit
IMT13962 pCosF1C6	IMT13962, pCosF1C6, <i>foc</i> ⁺	Schwein	diese Arbeit
MG1655	<i>E. coli</i> K-12, OR:H48, F ⁻ , λ^- , <i>ilvG</i> ⁻ , <i>rfb</i> -50, <i>rph</i> -1	Mensch	C. A. Cross, San Francisco, USA; (Blattner et al., 1997)

Fortsetzung Tab. 1

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft	Quelle; Referenz
P2005/03	aEPEC, O108:H9, Tet ^R	Schwein	R. Bauerfeind, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Universität Giessen
RZ525	UPEC, O6:K5:H1 <i>foc</i> ⁺ , <i>hlyA</i> ⁻	Mensch	U. Dobrindt, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg; (Zingler et al., 1992)
SF68	<i>Enterococcus faecium</i> Cernelle 68 (NCIMB 10415), probiotisch	Mensch	Cylactin®, Roche, Mannheim
<u><i>E. coli</i>-Referenzstämme für PCR</u>			
B41-1259	ETEC, O101:H- <i>fimF41a</i> ⁺ , <i>est-la</i> ⁺ , <i>fanA</i> ⁺ , <i>paa</i> ⁺	Rind	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Universität Giessen
CFT073	UPEC, O6:K5:H1, β-Häm, <i>foc</i> ⁺ , <i>fliA</i> ⁺ , <i>aroA</i> ⁺	Mensch	U. Dobrindt, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg
E2348/69	EPEC, O127:H6, NaI ^R <i>eae</i> ⁺ , <i>bpfA</i> ⁺ , <i>perA</i> ⁺	Mensch	J. B. Kaper, University of Maryland, Baltimore, USA
E57	EDEC, O138:K81 <i>fedA</i> ⁺ , <i>est-II</i> ⁺ , <i>est-la</i> ⁺	Schwein	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Universität Giessen; (Konowalchuk et al., 1977)
IMT2470	APEC, O2:K1:H5 <i>astA</i> ⁺	Huhn	Lohmann Tierzucht, Cuxhaven; (Ewers et al., 2007)
IMT2545	APEC <i>crf</i> ⁺ , <i>papC</i> ⁺ , <i>fimC</i> ⁺ , <i>sfa/foc</i> ⁺	Huhn	Institut für Geflügelkrankheiten, Freie Universität Berlin
IMT3838	<i>fasA</i> ⁺ , <i>est-la</i> ⁺	unbekannt	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Universität Giessen
IMT4830	<i>faeG</i> ⁺ , <i>est-II</i> ⁺ , <i>eltB-lp</i> ⁺	Schwein	IMT, FU Berlin

2.3 Plasmide und Vektoren

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Quelle; Referenz
pkD4	pANTs _γ , <i>kan</i> FRT-flankiert, Km ^R	(Datsenko und Wanner, 2000)
pkD46	pINT-ts, AraC, bla, oriR101, repA101ts, λ <i>red</i> (<i>gam</i> ⁺ <i>bet</i> ⁺ <i>exo</i> ⁺), Amp ^R	(Datsenko und Wanner, 2000)
pCos F1C6	Cosmid-Klon von SuperCos1, Insert enthält <i>foc</i> -Operon EcN, Amp ^R	T. Ölschläger, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Universität Würzburg

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) wurden von den Firmen Sigma Genosys (Steinheim) und Operon (Köln) bezogen. Die DNA-Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 3 bis Tab. 5 aufgelistet. Die Primer wurden aus Veröffentlichungen entnommen oder mit Hilfe des Programms HUSAR (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) generiert.

Tab. 3: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Zielregion	Name	Sequenz (5'→3')	Referenz
<i>astA</i>	<i>astA</i> FP	TGCCATCAACACAGTATATCC	(Yamamoto und Echeverria, 1996)
	<i>astA</i> RP	TAGGATCCTCAGGTCGCGAGTGACGGC	
<i>bfpA</i>	<i>bfp</i> FP	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	(Gunzburg et al., 1995)
	<i>bfp</i> RP	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	
<i>crlA</i>	<i>crl</i> FP	TTTCGATTGTCTGGCTGTATG	(Maurer et al., 1998)
	<i>crl</i> RP	CTTCAGATTTCAGCGTCGTC	
EAF-Plasmid	F-EAF FP	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	(Franke et al., 1994)
	F-EAF RP	TATGGGGACCATGTATTATCA	
<i>eaeA</i>	F-Eae A-1	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	(Yu und Kaper, 1992)
	F-Eae A-2	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA	
<i>eae</i> (β)	SK1 FP	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	(Oswald et al., 2000)
	LP4 RP	CCCGTGATACCAGTACCAATTACGGTC	
<i>eltB-lp</i>	LT-1	GGCGTTACTATCCTCTCTAT	(Bosworth und Casey, 1997)
	LT-2	TGGTCTCGGTCAGATATGT	
<i>est-Ia</i>	STaP-1	CAACTGAATCACTTGACTCTT	(Bosworth und Casey, 1997)
	STaP-2	TTAATAACATCCAGCACAGG	
<i>est-II</i>	STb-1	TGCCTATGCATCTACACAAT	(Bosworth und Casey, 1997)
	STb-2	CTCCAGCAGTACCATCTCTA	
<i>faeG</i>	K88-1	GAATCTGTCCGAGAATATCA	(Bosworth und Casey, 1997)
	K88-2	GTTGGTACAGGTCTTAATGG	
<i>fanA</i>	K99-1	AATACTTGTTCAAGGAGAAA	(Bosworth und Casey, 1997)
	K99-2	AACTTTGTGGTTAACTTCCT	
<i>fasA</i>	P987-1	AAGTTACTGCCAGTCTATGC	(Bosworth und Casey, 1997)
	P987-2	GTAACCTCCACCGTTTGTATC	
<i>fedA</i>	F18-1	TGGTAACGTATCAGCAACTA	(Bosworth und Casey, 1997)
	F18-2	ACTTACAGTGCTATTCGACG	
<i>fimC</i>	<i>fimC</i> FP	GGGTAGAAAATGCCGATGGTG	(Janßen et al., 2001)
	<i>fimC</i> RP	CGTCATTTTGGGGGTAAGTGC	
<i>fimF41a</i>	F41-1	AGTATCTGGTTCAGTGATGG	(Bosworth und Casey, 1997)
	F41-2	CCACTATAAGAGGTTGAAGC	
<i>ler</i>	Ler FP	TTTCGTCTTCGGTGTCTTTC	IMT, FU Berlin
	Ler RP	ACTGCGAGAGCAGGAAATTC	
<i>lifA/efa1</i>	<i>lifA</i> 1	AGCCATTCCATCAATCCGAT	(Jores et al., 2005)
	<i>lifA</i> 2	TCCCTGCCAAACTACCGACAC	
	<i>lifA</i> 3	CAGCTACAGGAGACCGTTTTT	
	<i>lifA</i> 4	CAATATCAGGCCAATCAA	

Fortsetzung Tab. 3

Zielregion	Name	Sequenz (5'→3')	Referenz
<i>paa</i>	PAACONS-L PAACONS-R	GGCCCGCATACAGCCTTG TCTGGTCAGGTCGTCAATACTC	(Boerlin et al., 2005)
<i>papC</i>	papC FP papC RP	TGATATCACGCAGTCAGTAGC CCGGCCATATTCACATAAC	(Janßen et al., 2001)
<i>perA</i>	perA FP perA RP	ATAGTTATATTTACGGGGGG TTATGGCAATGTNCRTTGTGTAATAG	(Okeke et al., 2001)
<i>pheU</i>	cadC2 cycZ1	AAATCTCATCAGTCGCCGTTT TTCACCCACGAACTGTAAACC	(Rumer et al., 2003)
<i>pheU/V-LEE</i>	1484c308	CCCGCAATTATACCCACACA	
<i>pheV</i>	4945PVd 6229PVr	ACTTCACCGCATGAGCAGTAA GTGCAGCGGCTGGAGTTTGGA	(Rumer et al., 2003)
<i>selC</i>	K260 K261 K295	GAGCGAATATTCCGATATCTGGTT CCTTGCAAATAAACACGGCGCAT CGCCGATTTTTCTTAGCCCA	(McDaniel et al., 1995)
<i>selC-LEE</i>	K296 K255	CATTCTGAAACAAACTGCTC GGTTGAGTCGATTGATCTCTGG	
<i>sfa/foc</i>	Sfa FP FocCD RP	CGGAGAACTGGGTGCATCTTA TCCTGACTCATCTGAAACTGCA	(Ewers et al., 2007)
<i>stx1</i>	Stx1-1 Stx1-2	TTCGCTCTGCAATAGGTA TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT	(Paton et al., 1995)
<i>stx2</i>	Stx2e-1 Stx2e-2	AATAGTATACGGACAGCGAT TCTGACATTCTGGTTGACTC	(Bosworth und Casey, 1997)

Tab. 4: Auflistung der für die Mutagenese nach Datsenko & Wanner verwendeten Oligonukleotide

Zielregion	Name	Sequenz (5'→3')	Referenz
<i>aroA</i>	aroA FP aroA RP	TAGCACACGGCAAAACAG ATCAGCAAAGCGAATATCACC	diese Arbeit
<i>fliA</i>	fliA FP fliA RP	CCCTGCAGAAACGGATAATCATG GGTGCTGCACCATCATTAAAGAAC	(Lane et al., 2005)
<i>kan</i> (pkD4)	k1 k2	CAGTCATAGCCGAATAGCCT CGGTGCCCTGAATGAACTGC	(Datsenko und Wanner, 2000)
<i>kan</i> (pkD4) mit flankierenden Homologien zu <i>aroA</i>	aroA H1P0 aroA H2P2	GGCATTAGCACACGGCAAAACAGTATTA ACCAATCTGCTGTGTAGGCTGGAGCTGC TTTCG CCATTTTTTCCAGAACATCAGCAAAGCGA ATTCACCCCATATGAATATCCTCCTTAG	diese Arbeit
<i>kan</i> (pkD4) mit flankierenden Homologien zu <i>fliA</i>	fliA H1P1 fliA H2P2	GTGAATTCACTCTATACCGCTGAAGGTG TAATGGATAAACAGTGTAGGCTGGAGCT GCTTC ACTTACCCAGTTTGTAGTGCCTAACCGTTTA ATGCCTGGCTGTGCATATGAATATCCTC CTTAG	diese Arbeit

2.5 Antikörper

Tab. 5: Auflistung der verwendeten Antikörper

Name	Reaktivität	Wirt	Markierung	Quelle; Referenz
<u>Primärintensoren</u>				
Anti-EspA	E2348/69 EspA	Kaninchen	-	J. B. Kaper, University of Maryland, Baltimore, USA
Anti-EspB	E2348/69 EspB	Kaninchen	-	J. B. Kaper, University of Maryland, Baltimore, USA
Anti-H1	<i>E. coli</i> Flaggelin H1	Kaninchen	-	L. Beutin, Nationales Referenzlabor für <i>E. coli</i> , BfR, Berlin
Anti-O108	<i>E. coli</i> O108	Kaninchen	-	BfR, Jena
Anti-Tir	E2348/69 Tir	Kaninchen	-	J. B. Kaper, University of Maryland, Baltimore, USA; (Elliott et al., 1999)
<u>polyklonale Sekundärintensoren</u>				
Anti-Kaninchen-IgG-HRP	Kaninchen-IgG	Ziege	HRP	Sigma-Aldrich, München
Anti-Kaninchen-IgG-TRITC	Kaninchen-IgG	Ziege	TRITC	Sigma-Aldrich, München
Anti-Kaninchen-IgG-FITC	Kaninchen-IgG	Ziege	FITC	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen-IgG-Gold	Kaninchen-IgG	Ziege	10 nm Gold	GE Healthcare, München

2.6 Chemikalien, Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe

Sofern nicht gesondert darauf hingewiesen, wurden die verwendeten Chemikalien von den Firmen Biochrom (Berlin), Fluka-Riedel-de Haën (Seelze), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Darüber hinaus wurden die nachfolgenden Enzyme und Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

BioTherm DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Phalloidin	Sigma-Aldrich, München
Propidiumiodid (PI)	Invitrogen, Karlsruhe

2.7 Kits

DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

2.8 Größenmarker

100 bp-DNA-Leiter extended	17 Fragmente, 100-5000 bp; Roth, Karlsruhe
Lambda Hind III Marker	8 Fragmente, 125-23130 bp; Roth, Karlsruhe
Prestained Protein Standard low range	vorgefärbt, 7 Fragmente, 20,7-103 kDa; Bio-Rad, München

2.9 Lösungen und Medien

Lösungen, Medien und Medienzusätze wurden, soweit nicht anders angegeben, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ hergestellt und für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Lösungen und Medienzusätze, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße). Nähragar wurde vor Zusatz von Antibiotika und Gießen in Petrischalen im Wasserbad auf 55 °C abgekühlt. Nachfolgend wurden von den Lösungen nur solche aufgeführt, die für verschiedenste Untersuchungen verwendet wurden. Spezielle Lösungen wurden bei den entsprechenden Methoden angegeben.

2.9.1 Allgemeine Lösungen

1xPBS:	8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na_2HPO_4 , 0,24 g/l KH_2PO_4 ; pH 7,4
--------	---

2.9.2 Medien für die Zellkultur

DMEM/HAM'S:	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)/HAM'S F-12 (1:1) (Biochrom, Berlin)
DMEM/HAM'S-FKS:	DMEM/HAM'S, 5 % fetales Kälberserum (FKS) (30 min hitzeinaktiviert bei 56 °C)
AS-Mangelmedium:	DMEM-F12 mit L-Glutamin ohne Aminosäuren (PAN-Biotek, Aidenbach)
aroAS-Mangelmedium:	DMEM-F12 mit L-Glutamin ohne Aminosäuren (PAN-Biotek, Aidenbach) Zugabe von folgenden Aminosäuren: Ala (4,50 mg/l), Arg (147,50 mg/l), Asn (7,50 mg/l), Asp (6,65 mg/l), Cys (15,75 mg/l), Gly (18,75 mg/l), His (31,50 mg/l),

	Ile (54,50 mg/l), Leu (59,00 mg/l), Lys (91,25 mg/l), Met (17,24 mg/l), Pro (17,25 mg/l), Ser (26,25 mg/l), Thr (53,5 mg/l), Val (52,85 mg/l)
AS-Medium:	aroAS-Mangelmedium Zugabe von aromatischen Aminosäuren: Phe (35,50 mg/l), Tyr (38,70 mg/l), Trp (9,00 mg/l)
HBSS-DTT:	Hank's Buffered Salt Solution (HBBS) (Biochrom, Berlin) 2 mM Dithiothreitol
HBSS-EDTA:	Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (Biochrom, Berlin) 1 mM Ethylendiamintetraacetat
RPMI:	RPMI-1640 (Biochrom, Berlin)

2.9.3 Nähr- und Selektivmedien für die Bakterienkultur

BHI-Medium:	37 g/l Hirn-Herz-Extrakt als Fertigpulver CMO225 Brain heart infusion (Oxoid, Basingstoke, UK)
LB-Medium:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl
SOC-Medium:	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 0,187 g/l KCl; pH 7,0, autoklavieren, auf 55 °C abkühlen, Zugabe von 20 mM Glukose aus steriler Stammlösung (1 M)
Blutagar:	15 g/l Pepton, 3 g/l Hefeextrakt, 6 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar; Autoklavieren, auf 55 °C abkühlen, 5 % defibriertes Schafsblut (Elocin, Mühlheim), 0,1 % Glukose aus steriler Stammlösung (20 %)
Chrom-Orientierung-Agar:	33 g/l CHROM Agar Orientation als Fertigpulver (CHROMagar, Paris, Frankreich)
Congorot-Agar:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 15 g/l Agar-Agar; autoklavieren, auf 55 °C abkühlen; Zugabe 0,04 % Congorot aus steriler Stammlösung (20 %)
Gassner-Agar:	47,7 g/l Wasserblau-Metachromgelb-Agar nach Gassner als Fertigpulver (Sifin, Berlin)
Glukose-Minimalagar:	15 g/l Difco Bacto-Agar, 445 ml H ₂ O _{bidest} , 50 ml 10xM9-Salze, 5 ml Glukose (20 %), 0,5 ml MgSO ₄ (1 M), 0,5 ml CaCl ₂ (1 M), 0,5 ml Ca ²⁺ -Pantothentat (1 mg/ml), 0,5 ml Thiamin (1 mg/ml); zunächst Agar in H ₂ O _{bidest} lösen, autoklavieren und auf 50 °C abkühlen; Zugabe weiterer Bestandteile aus sterilen Stammlösungen

10xM9-Salze:	5,964 g/l Na ₂ HPO ₄ , 2,994 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,482 g/l NH ₄ Cl
LB-Agar:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar
LB-Topagar:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 7 g/l Agar-Agar
LB-Weichagar:	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 2,5 g/l Agar-Agar

2.10 Verbrauchsmaterial

Blotmembran	Nitrozellulose, 0,2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen
Elektroporationsküvetten	2 mm, peqLab, Erlangen
Filterpapier	Whatmanpapier 3MM, Schleicher & Schüll, Dassel
Glasdeckgläser	Ø 10 mm, Thorns Biologie-Bedarf, Göttingen Ø 12 mm, 15 mm, Roth, Karlsruhe Ø 15 mm mit korrigierter Dicke ($0,17 \pm 0,01$ mm), Hecht-Assistent, Sondheim
Halbmikroküvetten	Theodor Karow, Berlin
Kodak Entwicklerkit	LX24 Entwickler, X-Ray Fixierer AL4, Sigma-Aldrich, Steinheim
Multilochplatten	12- und 24-Loch-Zellkulturplatten CellBIND, Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Mikrotiterplatten	Zellkultur Testplatte 96F, TPP, Trasadingen, Schweiz
Objektträger	76x26 mm, Roth, Karlsruhe
Röntgenfilm	Kodak Biomax XAR, Sigma-Aldrich, Steinheim
Serologische Pipetten	Stripette 10 ml, Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Spritzenfilter	Rotilabo-Spritzenfilter 0,22 µm und 0,45 µm Porengröße, Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	25 cm ² - und 75 cm ² -Schräghalsflaschen mit Belüftungskappe, Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande

2.11 Geräte

Absauger	Vacuboy, neolab, Heidelberg
Absaugpumpe	N735 AN18, KNF Neuberger, Freiburg
Agarosegelelektrophoresekammer	B1A und GE-B2, AGS, Heidelberg
Analysenwaage	BP210S, Sartorius, Göttingen
Autoklav	GTA 16, Gössner, Hamburg
Blotkammer	Mini Trans Blot, Bio-Rad, München
Elektroporationsgerät	EasyjecT Prima, peqLab, Erlangen
Epifluoreszenzmikroskop	Mikroskop DMBL, UV-Lampe ebq 100, Kamera

Fluorometer	DC300F, Leica Microsystems, Wetzlar
Fotodrucker Geldokumentation	Synergy HT, Bio-Tek, Bad Friedrichshall
Geldokumentation	P93E, Mitsubishi Electric, Ratingen
	UV-Transilluminator UVT 28 MP, Kamera
	E.A.S.Y. 429 K, Dokumentationssystem RM6,
	Herolab, Wiesloch
Grobwaage	BL3100, Sartorius, Göttingen
Inkubationsschränke	CB150, Binder, Tuttlingen
	VT 5042 EK/N2, Heraeus, Hanau
konfokales Laserscanningmikroskop	Leica DMIRE 2 Typ TCS SP2, Leica
	Microsystems, Wetzlar
Magnetrührer	IKAMAG RET, Theodor Karow, Berlin
Netzgerät Elektrophorese	PS 250, Hybaid, Lexington, USA
pH-Meter	Mikroprozessor pH-Meter 740, Knick, Berlin
Pipettierhilfe	Pipetus-akku, Hirschmann, Eberstadt
Rasterelektronenmikroskope	LEO 1430 und LEO 1530, Carl Zeiss NTS,
	Oberkochen
Reinstwassersystem	Millipore Simplicity, Millipore GmbH, Schwalbach
Scanner	DUOSCAN T1200, AGFA, Köln
Schüttelinkubator	GFL3031, GFL, Burgwedel
SDS-Page-Apparatur	Amersham, Freiburg
Spektrophotometer	Ultrospec 3000 pro, Amersham, Freiburg
Thermoblock	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen
Umkehrmikroskop	Telaval 31, Zeiss, Jena
Vortexer	MS2 Minishaker, IKA, Staufen
Wasserbäder	Grant OLS 200, CLF Laborgeräte, Burgwedel
	E-5, Julabo, Seelbach
Werkbank	LaminAir HB 2448 und LB-48-C, Heraeus, Hanau
Wippe	Roto-Shake Genie, Scientific Industries,
	Bohemia, USA
Zentrifugen	Rotina 46 R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
	3K30, Sigma Laborzentrifugen, Osterode
	5415D, Eppendorf Zentrifugen, Engelsdorf
	Avanti J-25, Beckmann Coulter, Krefeld

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Bakterienkultur

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Bakterien aus der Kryokultur (-80 °C) auf LB-Agarplatten angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Kulturen wurden maximal eine Woche bei 4 °C aufbewahrt. Für die Versuche wurden 1 bis 2 Kolonien in Flüssigmedium überimpft. *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium, der *E. faecium*-Stamm in BHI-Medium angezogen. Die zur Selektion eingesetzten Antibiotika und ihre Konzentrationen sind in Tab. 6 aufgelistet. Sie wurden als Stammlösungen (10 mg/ml) bei 4 °C gelagert und bei Bedarf in den entsprechenden Volumina dem Nährmedium zugesetzt.

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen

Antibiotikum	Abkürzung	Endkonzentration µg/ml
Ampicillin	Amp	100
Kanamycin	Km	20
Nalidixinsäure	Nal	30
Tetracyclin	Tet	5; 20

3.1.2 Bestimmung der Bakterienzahl

Zur Bestimmung der Bakterienzahl aus Schüttelkulturen oder Zellkulturüberständen wurden diese dezimal in 150 mM NaCl verdünnt und in dreifacher Wiederholung auf LB-Agar ausplattiert. Die Selektion der Stämme P2005/03 und E2348/69 aus Mischkulturen erfolgte auf Tet-LB- bzw. Nal-LB-Agar. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienzahl wurde aus der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet. Zur Rekultivierung Zum Einstellen einer bestimmten Bakterienzahl (*Multiplicity of infection*, MOI) für Adhäsions- und Infektionstests wurde die Bakterienkultur 1:20 verdünnt und deren optische Dichte photometrisch bei der Wellenlänge $\lambda=600$ nm gemessen (OD_{600}). Anhand zuvor durch Ausplattieren ermittelter, durchschnittlicher Bakteriendichten bei OD_{600} 1,0 wurde die Bakterienzahl wie folgt berechnet:

Bakterienzahl / ml = durchschnittliche Bakteriendichte bei OD_{600} 1,0 x OD_{600} x 20

Folgende durchschnittliche Bakteriendichten bei OD₆₀₀ 1,0 wurden für die einzelnen Stämme ermittelt:

P2005/03, E2348/69	5x10 ⁸ Bakterien/ml
EcN, MG1655, IMT13962, RZ525	4x10 ⁸ Bakterien/ml
SF68	3x10 ⁸ Bakterien/ml

3.1.3 Kryokonservierung von Bakterien

Für die Langzeitaufbewahrung von Bakterien wurden Kryokulturen angelegt. Die Bakterienstämme wurden in Kulturröhrchen in 6 ml Nährmedium bei 37 °C und 200 rpm bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ca. 2,0) angezogen. Stämme, die das temperatursensitive Plasmid pkD46 trugen, wurden bei 28 °C angezogen. Bei Vorhandensein von Antibiotikaresistenzen, die als Selektionsmarker dienten, wurde dem Nährmedium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt (Tab. 6). 1 ml Bakterienkultur wurde in Kryoröhrchen mit 330 µl 80 % Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

3.1.4 Gewinnung von Kulturüberständen

Zur Gewinnung von Kulturüberständen wurden die Bakterien in Nährmedium bis OD₆₀₀ 1,0 angezogen. Aus dieser Vorkultur wurden die Bakterien 1:100 in DMEM/HAM'S-FKS überimpft und erneut bis OD₆₀₀ 1,0 angezogen. Im Anschluss wurden die Kulturen bei 8000xg und 4 °C 15 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße). Die Kulturüberstände wurden frisch verwendet und bis 15 min vor Einsatz im Infektionstest auf Eis gestellt oder bei -20 °C verwahrt.

3.1.5 Isolierung von *E. coli* aus dem Darm von Schweinen

E. coli wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem Darm von drei 35 Tage alten Ferkeln der Rasse Landrasse x Duroc isoliert. Die Tiere wurden nicht extra für diese Versuche getötet, sondern die Probenentnahme erfolgte im Rahmen der Untersuchungen des DFG-Projektes FOR 438 des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin (Reg.-Nr. Tierversuch: G0037/02). Nach Euthanisierung der Tiere und Eröffnung der Bauchhöhle wurden ca. 10 cm lange Abschnitte aus dem distalen Jejunum und proximalen Colon entnommen, abgebunden, zweimal in 1xPBS gespült, in RPMI überführt und auf Eis transportiert. Die Präparation von Mukus und Epithelzellen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Solano-Aguilar et al. (2000). Dazu wurden die Darmabschnitte längs aufgeschnitten und mehrmals in 1xPBS gespült, bis das Spülmedium klar blieb und kein Darminhalt mehr auf der Mukosa zu erkennen war. Die Darmabschnitte wurden in ca. 2 cm

lange Segmente geschnitten und zum Ablösen des Mukus für 5 min bei 150 rpm und 37 °C in 30 ml HBSS-DTT geschüttelt. Das Darmgewebe wurde durch eine Gaze (200 µm Maschenweite) von Medium und Mukus getrennt. Der Mukus wurde auf Eis verwahrt. Das Darmgewebe wurde kurz in HBSS-DTT gespült und für 30 min bei 150 rpm und 37 °C in HBSS-EDTA geschüttelt. Im Anschluss wurde der Überstand mit den sich in Suspension befindenden Epithelzellen durch eine Gaze vom restlichen Gewebe getrennt und 10 min bei 600xg und 4 °C zentrifugiert. Die Epithelzellen und an ihnen anhaftende Bakterien wurden in 1xPBS resuspendiert. Sowohl der Mukus als auch die Epithelzellen wurden nach dezimaler Verdünnung in 150 mM NaCl in verschiedenen Verdünnungstufen mit je 100 µl auf Gassner-Agar ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, um das Wachstum von an Mukus oder Epithelzellen anhaftenden Bakterien zu ermöglichen. Gassner-Agar ist ein selektiver Nährboden für gramnegative Bakterien, v. a. für *Enterobacteriaceae*. Der Farbstoff Metachromgelb hemmt das Wachstum grampositiver Bakterien und zeigt anhand eines Farbumschlages zu blaugrün eine Laktoseverwertung gramnegativer Bakterien an (*E. coli*, *Klebsiella* sp. etc.). Diese bilden große, blaugüne Kolonien mit dunklem Zentrum und blaugrünem Hof (Gassner, 1918). Zur weitergehenden Identifizierung der Isolate wurden die Kolonien auf Chrom-Orientierung-Agar überimpft. Anhand der Farbbildung ihrer Kolonien konnte so die Bakterienspezies identifiziert werden. Die Farbbildung beruht auf der Umwandlung verschiedener chromogener Substanzen durch genus- oder speziesspezifische Enzyme. Kolonien von *E. coli* erscheinen hierbei pink bis rot (Merlino et al., 1996). Das *E. coli*-Isolat IMT13962, welches als Vergleichsstamm eingesetzt wurde, wurde zusätzlich mit Hilfe der Biochemischen Reihe ID32E (bioMerieux, Lyon, Frankreich) als *E. coli* identifiziert.

3.1.6 Mikrozintest

Die Bildung von Mikrozininen durch *E. coli* sowie die Empfindlichkeit gegenüber Mikrozininen wurde im Hemmtest in Anlehnung an die Methode von Patzer et al. (2003) überprüft. Als mikrozinsensitiver Indikatorstamm diente H5316, als mikrozinbildender Indikatorstamm EcN. Die Test- und Indikatorstämme wurden in LB-Medium bei 200 rpm und 37 °C bis zur spätlogarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ca. 2,0) angezogen. LB-Topagar wurde durch Erhitzen verflüssigt. Jeweils 6 ml wurden in einem Kulturröhrchen auf 50 °C abgekühlt. Die Bildung von Mikrozin wird durch Eisenmangel stimuliert (Patzer et al., 2003). Deshalb wurde dem Topagar zur Komplexierung freier Fe(III)-Ionen 0,4 mM 2,2'-Bipyridil zugefügt. Der Topagar wurde im Anschluss mit 100 µl Kultur des mikrozinsensitiven Indikatorstammes H5316 bzw. eines auf Empfindlichkeit zu überprüfenden Teststammes supplementiert, gut durchmischt und zügig auf eine LB-Agarplatte gegossen. Nach dem Erstarren des Topagars wurde ein Filterpapierplättchen (Whatman 3MM, Ø 5 mm) auf die Oberfläche gelegt, auf das

10 µl Kultur des auf Mikrozinbildung zu überprüfenden Teststammes bzw. des Indikatorstammes EcN getropft wurden. Die Testplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bildung von Mikrozinen durch einen auf das Filterpapierplättchen applizierten Stamm führte aufgrund der Diffusion der Mikrozine in den umliegenden Topagar zur lokalen Abtötung eines mikrozinsensitiven Stammes. Dieses wurde durch einen klaren Hemmhof um das Filterpapierplättchen auf dem sonst trüben Topagar angezeigt.

3.1.7 Motilitätstest

LB-Kulturen der zu testenden *E. coli*-Stämme wurden exakt auf OD₆₀₀ 1,0 eingestellt und mit Hilfe einer Impfnadel auf eine LB-Weichagarplatte übertragen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Motilität der Bakterien wurde durch die Bildung eines kreisrunden Schwärmhofes um den Einstichpunkt angezeigt.

3.1.8 Nachweis von Curli-Fimbrien

Die *E. coli*-Bakterien wurden mit einer Impföse von LB-Agar auf Congorot-Agar überimpft und für 48 h bis 72 h bei 37 °C inkubiert. Curli-positive Stämme zeichneten sich durch tiefrote Kolonien mit rauer und trockener Oberfläche aus. Curli-negative Stämme hingegen bildeten glatte, glänzende, weiße Kolonien aus.

3.1.9 Hämolyse-Test

Die *E. coli*-Stämme wurden von LB-Agar durch einen Verdünnungsausstrich auf Blutagar überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei Bildung von β -Hämolysin wurden die im Blut enthaltenen Erythrozyten zerstört und das Hämoglobin vollständig abgebaut, was anhand klarer, scharf abgrenzbarer Höfe um die Kolonien angezeigt wurde.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Standardzellkultur

Die IPEC-J2-Zellen wurden in 10 ml DMEM/HAM'S-FKS in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 95 % bei 37 °C. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Die Zellen wurden im Abstand von 7 bis 8 Tagen subkultiviert.

3.2.2 Subkultivierung von Zellen

Adhärenz wachsende Zellen wurden nach Erreichen eines konfluenten Monolayers durch enzymatisches Aufbrechen der Zell-Matrix-Verbindung mit Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst und 1:10 verdünnt in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche gesät. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 10 ml 1xPBS gewaschen und für ca. 10 min bei 37 °C in 5 ml 0,05 %/0,02 % Trypsin/EDTA in 1xPBS inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1 min bei 155xg und Raumtemperatur zentrifugiert, in 10 ml 1xPBS gewaschen, erneut zentrifugiert und im Anschluss in 5 ml DMEM/HAM'S-FKS aufgenommen. 5×10^5 Zellen wurden in eine neue Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Wechsel des Mediums.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde nach Trypsinierung (3.2.2) und Waschen der Zellen mit 1xPBS ein Aliquot der Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt und am Umkehrmikroskop in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Konzentration der Zellen wurde durch Multiplikation der aus 4 Großquadranten gemittelten Anzahl nicht blau gefärbter und demnach lebender Zellen mit dem Kammerfaktor (1×10^4 Zellen) und dem Verdünnungsfaktor (10) errechnet.

3.2.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen kryokonserviert. 24 h vor der Subkultivierung erfolgten ein Wechsel des Mediums und die Zugabe von Penicillin/Streptomycin (100 Einheiten bzw. 100 µg/ml). Nach Trypsinierung (3.2.2) und Waschen der Zellen wurden je 1×10^6 Zellen in 1,8 ml DMEM/HAM'S-FKS und 200 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) in Kryoröhrchen überführt, für kurze Zeit auf Eis inkubiert und über Nacht bei -80 °C gelagert. Im Anschluss wurden die Röhrchen zur Langzeitlagerung bei -196 °C in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung der Zellen wurden diese direkt nach der Entnahme aus dem Stickstoffbehälter in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml warmen Zellkulturmedium in eine 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Nach einer Ruhephase von 24 h wurde das Medium gewechselt, um das zytotoxische DMSO und abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.2.5 Adhäsionstest

Für die Adhäsionstests wurden 1×10^5 bzw. 5×10^4 Zellen/Loch in 1 ml bzw. 500 μ l DMEM/HAM'S-FKS in 12- bzw. 24-Loch-Zellkulturplatten eingesät (3.2.2). Die Zellen wurden nach Ausbildung eines konfluenten Zellmonolayers innerhalb von 5 bis 7 Tagen nach dem Aussähen für den Zelltest genutzt. Die durchschnittliche Anzahl der Zellen betrug dann $2,6 \times 10^5$ bzw. $1,3 \times 10^5$ Zellen/Loch. Vor Testbeginn wurde das Medium erneuert.

Zur Herstellung des Inokulums wurden die Bakterien in LB- bzw. BHI-Medium bei 200 rpm und 37 °C bis zur OD₆₀₀ 1,0 angezogen, 5 min bei 8000xg zentrifugiert und in DMEM/HAM'S-FKS resuspendiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Epithelzellen mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI; Anzahl Bakterien/Wirtszelle) von 100 inokuliert (Volumen Inokulum 100 bzw. 50 μ l). Die Zellkulturplatten wurden vorsichtig geschwenkt, um die Bakterien gleichmäßig zu verteilen, und für einen definierten Zeitraum im Brutschrank bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 95 % bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit je 2 ml 1xPBS gespült, um nicht adhären te Bakterien zu entfernen, und mit 1 ml 0,1 % Triton X-100 in H₂O_{bidest} lysiert. Das Lysat wurde dezimal in 150 mM NaCl verdünnt, in dreifacher Wiederholung auf LB-Agar ausplattiert und die Agarplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl adhären ter Bakterien wurde durch Zählung der koloniebildenden Einheiten (KBE) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt.

3.2.6 Infektionstest

Zellen und Bakterien wurden analog zum Adhäsionstest vorbereitet und die Zellen mit den Bakterien infiziert. Nach 3 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS gespült, mit frischem DMEM/HAM'S-FKS bedeckt und für weitere 3 h im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit von 6 h ermöglichte die Bildung von Mikrokolonien porciner aEPEC. Aufgrund der generell niedrigen Infektionsrate des verwendeten porcinen aEPEC-Stammes P2005/03 an IPEC-J2 wurde mit einer MOI von 100 gearbeitet. Der Nährstoffverbrauch und die durch Wachstum und Stoffwechsel der Bakterien verursachte Ansäuerung des Mediums implizierten den Wechsel des Mediums nach 3 h, um eine Hemmung des Bakterienwachstums und ein Ablösen des Monolayers zu verhindern. Die Infektion der Zellen mit dem humanen typischen EPEC-Stamm E2348/69 erfolgte für 3 h, da dieser im Gegensatz zum porcinen aEPEC-Stamm eine sehr viel höhere Infektionsrate und eine schnellere Mikrokoloniebildung aufwies. Die Infektionsrate wurde jeweils nach dreimaligem Waschen mit 1xPBS, Lysis der Zellen mit 0,1 % Triton X-100 in H₂O_{bidest} und anschließendem Ausplattieren auf LB-Agar mit Antibiotikazusatz selektiv bestimmt. Dazu wurde dem LB-Agar Tetracyclin (5 μ g/ml) für P2005/03 oder Nalidixin (30 μ g/ml) für

E2348/69 zugegeben. Die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) im definierten Zeitraum entsprach der Infektionsrate.

Um den Einfluss von Bakterienstämmen auf die Infektion zu untersuchen, wurden diese vor-, ko- oder nachinkubiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden sie mit einer MOI von 100 eingesetzt. Bei Vorinkubation wurden die Bakterien 2 h vor der Infektion appliziert und vor Zugabe von P2005/03 bzw. E2348/69 nicht adhären te Bakterien durch dreimaliges Waschen der Zellen mit 1xPBS entfernt. Bei Ko- und Nachinkubation wurden die Bakterien gleichzeitig bzw. 1 h später als P2005/03 bzw. E2348/69 appliziert. Abb. 4 gibt einen schematischen Überblick zum zeitlichen Ablauf der Infektionstests. Um die Anzahl adhären ter Bakterien der vor-, ko- oder nachinkubierten Stämme zu bestimmen, wurden die Lysate zusätzlich auf LB-Agar ausplattiert, die Gesamtzahl adhären ter Bakterien bestimmt und im Anschluss die Zahl adhären ter aEPEC/EPEC-Bakterien subtrahiert.

Der Einfluss von Kulturüberständen auf die aEPEC-Infektion wurde durch Vor- und Koinkubation überprüft. Die Kulturüberstände wurden aus Schüttelkulturen in DMEM/HAM'S-FKS gewonnen (3.1.4) und unverdünnt eingesetzt.

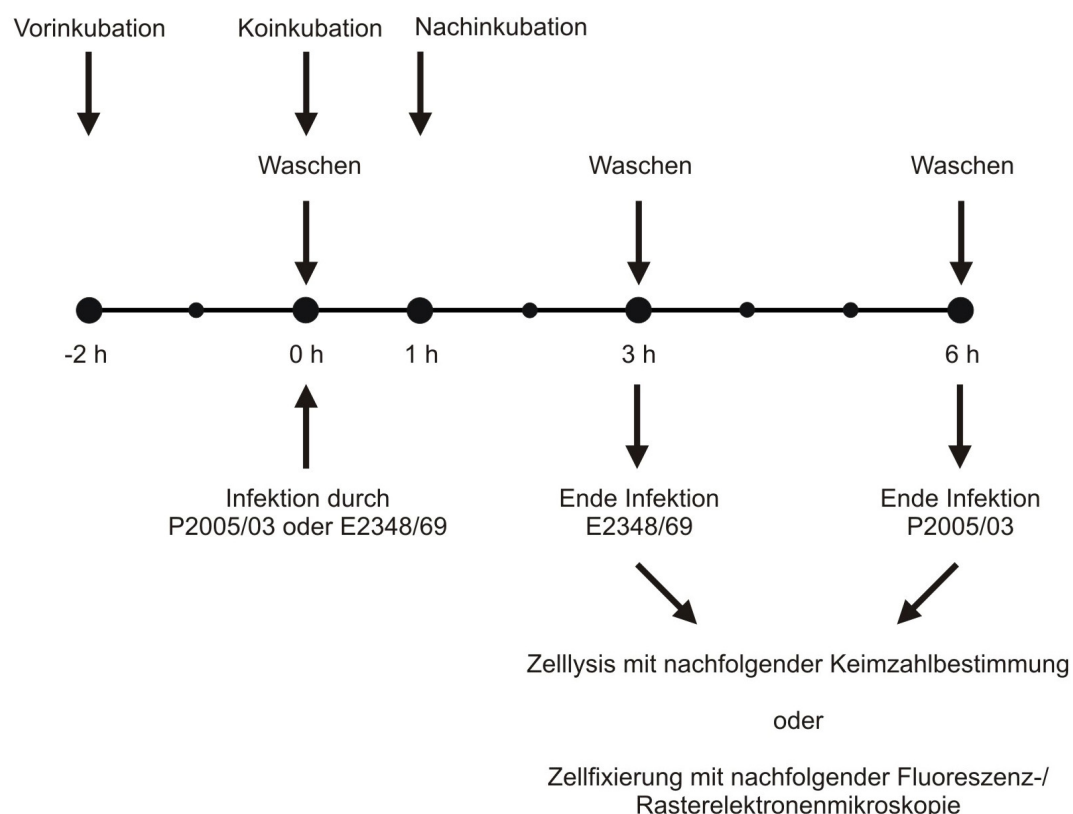


Abb. 4: Schema zum zeitlichen Ablauf des Infektionstests

3.2.7 Wachstumskinetik adhärenter aEPEC an IPEC-J2

Mit Hilfe von Wachstumskinetiken wurde das Wachstum adhärenter Bakterien von aEPEC an den Epithelzellen ermittelt. Dazu wurden IPEC-J2-Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten für 2 h mit P2005/03 infiziert. Dieser Zeitraum ermöglichte eine Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle, nicht jedoch die Bildung von Mikrokolonien. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen. Die Verdopplungszeit für P2005/03 im Zellkulturüberstand betrug 30 min. Um das erneute Anheften von Bakterien aus dem Überstand an die Zellen zu vermeiden, wurden die Überstände alle 30 min abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Über einen Zeitraum von 2,5 h wurde ebenfalls alle 30 min die Zahl adhärenter Bakterien durch Zelllysis und Ausplattieren auf Tet-LB-Agar bestimmt. Das Wachstum der Mikrokolonien wurde mit Hilfe von Wachstumskurven (halblogarithmisches Auftragen der Zahl adhärenter Bakterien pro Zeitpunkt) und durch Ermittlung von Verdopplungszeit t_d , Teilungsrate v und Wachstumsrate μ während der logarithmischen Wachstumsphase charakterisiert.

$$t_d = t / n$$

t = Zeitraum der Messung

n = Zahl der Generationen bzw. Teilungen

$$n = (\log N - \log N_0) / \log 2$$

N = Zahl der Bakterien nach n Teilungen

N_0 = Zahl der Bakterien zu Beginn des Versuchs

$$v = n / t$$

$$\mu = \ln 2 / t_d$$

Der Einfluss von EcN auf das Mikrokoloniewachstum von P2005/03 wurde nur bei Vorinkubation ermittelt. Dazu wurde EcN auf IPEC-J2 2 h vorinkubiert. Vor Infektionsbeginn wurden alle nicht adhärenen Bakterien von EcN durch dreimaliges Waschen mit 1xPBS entfernt (3.2.6).

3.3 Mikroskopische Methoden

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie

3.3.1.1 Fixierung von Zellen

Für Zellkulturtests mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie wurden die IPEC-J2-Zellen in 12- bzw. 24-Loch-Zellkulturplatten auf Glasdeckgläsern kultiviert (3.2.5). Für die konfokale

Laserscanningmikroskopie wurden Deckgläser mit korrigierter Dicke verwendet ($0,17 \pm 0,01$ mm). Die Fluoreszenzmikroskopie schloss sich an Adhäsions- oder Infektionstests an (3.2.5, 3.2.6). Dazu wurden die Zellen in 4 % PFA oder Aceton fixiert.

PFA-Fixierung

Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser mit 1xPBS wurden diese in eine neue 12- bzw. 24-Loch-Zellkulturplatte überführt, mit je 500 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) bedeckt und über Nacht bei 4 °C gelagert.

Herstellung von 4 % PFA

60 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurden im Wasserbad auf 60 °C erwärmt. Es wurden 4 g PFA zugegeben und zum Lösen des PFA unter Rühren tropfenweise 2 M NaOH zugesetzt. Nach Zugabe von 33,2 ml 3xPBS wurde der pH-Wert mit 1 M HCl auf 7,4 eingestellt, die Lösung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 100 ml aufgefüllt, über einen Membranfilter (0,22 µm Porengröße) sterilfiltriert und in 10 ml-Aliquots bei -20 °C gelagert.

Acetonfixierung

Nach dreimaligem Waschen der Deckgläser mit 1xPBS wurden diese in Glasschalen (Ø 4 bis 5 cm) überführt, mit -20 °C kaltem Aceton überschichtet und für 2 min bei -20 °C inkubiert. Die Deckgläser wurden dreimal mit 1xPBS gewaschen, in eine neue 12- bzw. 24-Loch-Zellkulturplatte überführt und mit 500 µl 0,5 % BSA in 1xPBS bedeckt. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bei 4 °C gelagert.

3.3.1.2 Immunohistochemische Färbungen

Zum Nachweis spezifischer extrazellulärer bakterieller Antigene wurden diese indirekt immunohistochemisch angefärbt. Dazu wurden die fixierten Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen. Nach fünfminütiger Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit 0,5 % BSA in 1xPBS wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem Primärantikörper inkubiert (25 µl, 1:50 verdünnt in 0,5 % BSA in 1xPBS). Überschüssige Antikörper wurden im Anschluss durch dreimaliges Waschen mit 1xPBS entfernt. Die Zellen wurden für weitere 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Kammer mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper inkubiert (25 µl, 1:200 verdünnt in 0,5 % BSA in 1xPBS). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit 1xPBS wurden die Zellen entweder eingedeckt (3.3.1.5) oder für weitere Färbungen (Aktin, DNA) verwendet (3.3.1.3, 3.3.1.4). Eine Übersicht über die mittels Immunohistochemie nachgewiesenen Antigene und die dafür eingesetzten Antikörper gibt die Tab. 7.

Tab. 7: Auflistung der in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesenen Antigene unter Angabe der verwendeten Antikörper

Antigen	Primärantikörper	Sekundärantikörper
<i>E. coli</i> O108	Anti-O108	Anti-Kaninchen-IgG-TRITC
<i>E. coli</i> H1	Anti-H1	Anti-Kaninchen-IgG-FITC

3.3.1.3 FAS-Test

Der FAS-Test (*Fluorescence actin staining*) dient zum Nachweis der durch EPEC hervorgerufenen *Attaching and Effacing*-Läsionen (A/E-Läsionen) an der Wirtszelle durch Färbung von Aktin (Knutton et al., 1989). Das Strukturprotein Aktin ist wesentlicher Bestandteil des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen. EPEC induzieren nach Anheftung an die Wirtszelle eine radikale Reorganisation des Wirtszytoskeletts und im Zuge der Podestbildung eine Akkumulation von Aktinfilamenten unterhalb der Anheftungsstelle der Bakterien (siehe Kapitel 1.3.5). Aktin wird durch Phalloidin gebunden, welches durch vorherige Markierung mit dem Fluorophor Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden kann. Charakteristische Aktinakkumulationen von A/E-Läsionen lassen sich dabei deutlich als intensiv fluoreszierende Bereiche vom restlichen Aktingerüst der Zelle unterscheiden und sind FAS-positiv.

Die fixierten Zellen wurden dreimal mit 1xPBS gewaschen. PFA-fixierte Zellen wurden zunächst permeabilisiert, um die Zellmembran für die Farbstoffe durchlässig zu machen. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml eiskaltem 0,1 % Triton X-100 in 1xPBS überschichtet, 4 min auf Eis inkubiert und nochmals dreimal mit 1xPBS gewaschen. Bei acetontfixierten Zellen war der Einsatz von Detergenzien nicht notwendig, da Aceton die hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Proteinstruktur der Zellmembran auflöst und diese dadurch permeabel wird. 25 µl Phalloidinfärbelösung (5 µg/ml FITC-Phalloidin in 1xPBS) wurden auf das Deckglas aufgetropft, so dass die Zellen gleichmäßig bedeckt waren. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Kammer. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen und entweder eingedeckt (3.3.1.5) oder für die DNA-Färbung verwendet (3.3.1.4).

3.3.1.4 DNA-Färbung

Die DNA-Färbung diente der Visualisierung von Zellkernen und Bakterien. Die Präparate wurden mit Propidiumiodid (PI) angefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff PI interkaliert in die DNA-Helix und färbt diese spezifisch an. PFA-fixierte Zellen wurden zunächst permeabilisiert (3.3.1.3). Eine Permeabilisierung war nicht nötig, wenn sich die DNA-Färbung direkt an die

Phalloidininfärbung anschloss. Die Zellen wurden dreimal mit 1xPBS gewaschen. 25 µl der Färbelösung (5 µg/ml PI in 1xPBS) wurden auf das Deckglas aufgetropft und dieses für 5 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit in einer feuchten Kammer inkubiert. Das Deckglas wurde im Anschluss dreimal mit 1xPBS gewaschen und eingedeckt (3.3.1.5).

3.3.1.5 Eindecken der Präparate

Die Deckgläser wurden kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen, um eine Anlagerung von Salzkristallen aus dem 1xPBS zu verhindern. Die Deckgläser wurden für 10 min bei 37 °C in Dunkelheit getrocknet und anschließend auf Objektträgern mit der Zellseite nach unten mit 5 µl MobiGLOW (MoBiTec, Göttingen) eingedeckt. Zum Schutz vor weiterer Austrocknung wurde der Rand der Deckgläser mit Nagellack abgedichtet. Die Präparate wurden bis zur Betrachtung am Fluoreszenzmikroskop lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.1.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Beurteilung der Präparate erfolgte mit dem Epifluoreszenzmikroskop Leica DMBL sowie mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop Leica DMIRE 2 TCS SP2. Das Epifluoreszenzmikroskop war mit den Filtern D (BP355-425, 455, LP470), L5 (BP480/40, 505, BP527/30) und Y3 (BP 545/30, 565, BP610/75) sowie den Objektiven HCX PL FLUOTAR 10x/0.30 PH1, 20x/0.50 PH2, 40x/0.75 PH2 und 100x/1.30 OIL ausgestattet. Als Lichtquelle diente eine 100 W-Quecksilberhöchstdrucklampe (Osram, München). Die Bilder wurden über ein Kamerasystem (DC300F) aufgenommen, digital gespeichert und über das Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems, München) weiter bearbeitet. Das konfokale Laserscanningmikroskop war mit den Lasern Ar 458, 476, 488, 514, HeNe 543 und HeNe 633 als Lichtquelle ausgestattet. Es wurde mit dem Objektiv HCX APA 63x/1.40-0.60 OIL gearbeitet. Die Bildaufnahme und -bearbeitung erfolgten mit Hilfe der Leica Confocal Software. Tab. 8 gibt einen Überblick über die in der Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Fluorochrome, deren Exzitations- und Emissionsmaxima und die zu verwendenden Anregungsfilter bzw. Laser.

Tab. 8: Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluorochrome und zugehörige Anregungsfilter/Laser im Epifluoreszenz- bzw. konfokalen Laserscanningmikroskop

Fluorochrom	Exzitations- maximum	Emmissions- maximum	Filter Epifluoreszenz- mikroskop	Laser konfokales Laserscanningmikroskop
FITC	495 nm	520 nm	L5	Ar 458, 476, 488, 514
TRITC	552 nm	570 nm	Y3	HeNe 543
PI	535 nm	617 nm	Y3	HeNe 543

3.3.1.7 Quantitative Auswertung der Mikrokoloniebildung

Zur quantitativen Auswertung der Mikrokoloniebildung durch aEPEC auf IPEC-J2 wurden die Zellen auf Deckgläser kultiviert, infiziert und in PFA fixiert (3.2.6, 3.3.1.1). Im Anschluss wurde die immunohistochemische Färbung gegen *E. coli* O108 (3.3.1.2), der FAS-Test (3.3.1.3) und die DNA-Färbung (3.3.1.4) durchgeführt. Nach Eindecken der Präparate (3.3.1.5) wurden diese am Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet (3.3.1.6). Dazu wurden pro Deckglas 10 zufällig ausgewählte, aber über das Präparat gleichmäßig verteilte Sichtfelder mit 400-facher Vergrößerung fotografiert. Die Fläche eines Sichtfeldes betrug dabei 0,059 mm² und umfasste im Durchschnitt 90 Zellen eines konfluenten Zellmonolayers. Die Bilder wurden digital gespeichert und im Anschluss mit Adobe Photoshop 8.0 (Adobe Systems, München) visuell ausgewertet. Die Auswertung erfolgte nach folgenden Kriterien: Anzahl der Kolonien, Kolonie FAS-positiv/-negativ und Anzahl der Bakterien pro Kolonie. Die Anzahl der Bakterien pro Kolonie wurde in folgende Kategorien unterteilt: 1 bis 3: vereinzelt adhärenente Bakterien, 4 bis 10: kleine Kolonie, 11 bis 20: mittelgroße Kolonie, mehr als 20: große Kolonie. Bei sehr kompakten Kolonien, bei denen eine genaue Zählung der Bakterien nicht möglich war, wurde die Anzahl bestmöglich geschätzt. Jede Variante wurde in 2 unabhängigen Tests jeweils im Doppelansatz untersucht und die Werte gemittelt.

3.3.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Molekulare Parasitologie der Humboldt-Universität zu Berlin und dem Zentrum für Biologische Sicherheit 4 des Robert-Koch-Instituts Berlin (RKI). Die Adhäsions- und Infektionstests (3.2.5, 3.2.6) wurden selbst durchgeführt. Die Präparationen der Proben und die Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop erfolgten durch Herrn Dr. Wilfried Bleiß, Humboldt-Universität (konventionelle Rasterelektronenmikroskopie) und Frau Gudrun Holland, RKI (Immunogoldmarkierung mit anschließender Rasterelektronenmikroskopie). Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die IPEC-J2-Zellen in 24-Loch-Zellkulturplatten auf Glasdeckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm eingesät.

3.3.2.1 Konventionelle Rasterelektronenmikroskopie

Die Proben wurden über Nacht bei 4 °C in 2 % Glutardialdehyd + 0,05 % CaCl₂ in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer (pH 7,4) fixiert, dreimal je 30 min bei 4 °C mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer gewaschen, für 3 h bei 4 °C in 1 % OsO₄ in 0,1 M Na-Cacodylatpuffer fixiert und nochmals gewaschen. Es schloss sich eine alkoholische Entwässerungsreihe an (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, je 30 min bei 4 °C; 96 %, 2x 100 %, je 30 min bei Raumtemperatur; Ethanol-Aceton-

Gemisch (1:1), 2x Aceton je 30 min bei Raumtemperatur). Danach wurden die Proben am kritischen Punkt aus flüssigem CO₂ getrocknet (CPD 030, BAL-TEC, Witten) und mit 20 nm-Goldpartikeln beschichtet (SCD 005, BAL-TEC, Witten). Das Betrachten der Proben erfolgte am Rasterelektronenmikroskop LEO 1430 (LEO Elektronenmikroskopie, Oberkochen).

3.3.2.2 Immunogoldmarkierung

Die Immunogoldmarkierung diente der spezifischen Anfärbung des aEPEC-Stammes P2005/03 auf IPEC-J2-Zellen und der klaren Abgrenzung gegenüber EcN im rasterelektronenmikroskopischen Bild. Die Proben wurden für 1 h in 4 % PFA + 0,5 % Glutardialdehyd in 1xPBS bei Raumtemperatur fixiert und anschließend über Nacht in 4 % PFA in 1xPBS bei 4 °C gelagert. Der Transport der Proben erfolgte auf Eis. Für die Immunogoldmarkierung wurden die Proben zunächst dreimal je 10 min mit 1xPBS gewaschen und 30 min bei Raumtemperatur mit 0,5 % BSA + 0,1 % Gelatine in 1xPBS geblockt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 1 h mit dem Primärantikörper Anti-O108 oder zur Kontrolle mit Kaninchenserum (je 1:100 in Blockpuffer). Die Proben wurden viermal je 5 min in Blockpuffer gewaschen und danach für 1 h mit dem Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-Gold (1:100 in Blockpuffer) inkubiert. Die Proben wurden dreimal je 5 min mit 0,05 M HEPES (pH 7,2) gewaschen und für 15 min in 2,5 % Glutardialdehyd in 0,05 % HEPES (pH 7,2) fixiert. Zur Verbesserung der optischen Lokalisation der Goldpartikel wurden diese versilbert. Dazu wurde das IntenSEM Kit (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben und *Gummi arabicum* (30 %, Aurion, Wageningen, Niederlande) verwendet. Im Anschluss wurden die Proben wieder in 2,5 % Glutardialdehyd in 0,05 % HEPES (pH 7,2) überführt und bis zur Rasterpräparation bei 4 °C aufbewahrt.

Für die weitere Präparation der Proben wurden diese zunächst dreimal in H₂O_{bidest} gewaschen. Es schloss sich eine alkoholische Entwässerungsreihe an (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 96 %, je 15 min bei Raumtemperatur; 2x 100 %, je 30 min bei Raumtemperatur). Die Proben wurden zweimal je 15 min mit Hexamethyldisilazan (HMDS) infiltriert, luftgetrocknet und im Anschluss mit ca. 1,5 nm-Kohlepartikeln bedampft (BAE 250, BAL-TEC, Witten). Das Betrachten der Proben erfolgte am Rasterelektronenmikroskop LEO 1530 (LEO Elektronenmikroskopie, Oberkochen).

3.4 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. (1989) verwendet oder daran angelehnt.

3.4.1 Isolierung von DNA

3.4.1.1 Isolierung chromosomaler DNA

Chromosomale DNA, die als Vorlage für die PCR diente, wurde mittels Hitzelyse aus Bakterien gewonnen. Die Bakterien wurden in 6 ml LB-Medium bei 37 °C bis zur OD_{600} ca. 1,5 angezogen und 500 µl der Kultur bei 8000xg 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in H_2O_{bidest} resuspendiert und die Lösung exakt auf die OD_{600} 1,0 eingestellt. 300 µl wurden 10 min bei 99 °C erhitzt, 10 min auf Eis gestellt und im Anschluss 10 min bei 16000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert (100 µl) und bei -20 °C aufbewahrt. Für die Herstellung von Mutanten nach der Methode von Datsenko & Wanner (3.4.7) wurde als PCR-Vorlage chromosomale DNA verwendet, die mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet wurde. Die Verwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 50 µl $H_2O_{millipore}$ eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C in LB-Medium angezogen. 1,5 ml Kultur wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 16000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals in 1,0 ml Kultur resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet vollständig in 100 µl Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II und Durchmischen der Probe für 10 s mittels Vortexer erfolgte die Lyse nach Sicht für ca. 10 min bei Raumtemperatur. Zur Probe wurden 150 µl Lösung III zugegeben. Die Probe wurde unmittelbar danach für 5 s durchmischt, 10 min auf Eis inkubiert und 3 min bei 16000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Großteil der in der Probe enthaltenen chromosomalen DNA, Proteine und Zelldebris wurden dadurch ausgefällt und sedimentiert. Der Überstand wurde ohne Mitnahme von Präzipitat in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zur Reinigung und Konzentration der Plasmid-DNA schloss sich eine Phenol-Chloroform-Extraktion an (3.4.2).

Lösung I:	25 mM TRIS-HCl (pH 8,0), 50 mM Glukose, 2 mM EDTA; bei 4 °C gelagert
Lösung II:	200 mM NaOH, 1 % SDS; frisch hergestellt, bei Raumtemperatur gelagert
Lösung III:	58,9 g KOAc, 50 ml HOAc (glazial), 150 ml H_2O_{bidest} ; pH 4,5-5,0, bei 4 °C gelagert

3.4.1.3 Isolierung von Cosmid-DNA

Cosmide wurden aufgrund ihrer Größe mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) aufgearbeitet. Die Verwendung des Kits erfolgte nach Herstellerangaben unter besonderer Berücksichtigung der Hinweise für Cosmide. Die DNA wurde mit 30 µl H₂O_{millipore} (auf 70 °C vorgewärmt) eluiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Aufreinigung von DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion diente zur Abtrennung von Proteinen aus wässrigen DNA-Lösungen bei Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien sowie zum Aufreinigen von DNA nach enzymatischen Reaktionen. Das Ansatzvolumen der wässrigen DNA-Probe wurde auf 300 µl gebracht. Es wurden 500 µl Phenol zugegeben, die Probe 1 min bei mittlerer Geschwindigkeit mittels Vortexer durchmischt und 3 min bei 16000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Die untere, organische Phase (Phenol) wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Um verbliebene Phenolmengen zu entfernen, wurde die obere, wässrige Phase mit 600 µl Chloroform versetzt, 1 min durchmischt und 3 min bei 16000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Die untere organische Phase (Chloroform) wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Der Reinigungsschritt wurde noch einmal wiederholt.

Durch eine Ethanol-Natriumacetat-Fällung wurde die DNA konzentriert und gleichzeitig von Phenol- und Chloroformresten oder Pufferkomponenten befreit. Die DNA-Lösung wurde hierfür mit dem 0,1-fachen Volumen an 3 M NaOAc (pH 4,0-5,0) und dem 2,5-fachen Volumen an eiskalten, absoluten Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei -20 °C inkubiert und anschließend 1 h bei 30000xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Reaktionsgefäß sowie das DNA-Pellet vorsichtig mit 70 % Ethanol gespült. Das Ethanol wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet bei 37 °C für ca. 10 min getrocknet. Im Anschluss wurde die DNA in 50 µl H₂O_{millipore} gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von wässrigen DNA-Lösungen wurde photometrisch bei $\lambda=260$ nm in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke bestimmt. Die Berechnung erfolgte gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

$$E_{260} = \varepsilon \times c \times d$$

E_{260} = gemessene Extinktion bei OD_{260}

ε = molarer Extinktionskoeffizient ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

ε für doppelsträngige DNA bei $\text{OD}_{260} 1 = 1/50 \text{ l mol}^{-1} \text{cm}^{-1} = 1/50 \text{ ml } \mu\text{g}^{-1} \text{cm}^{-1}$

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

c = DNA-Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

$c = E_{260} \times 50 \mu\text{g ml}^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor}$

3.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente dem Amplifizieren spezifischer Genomabschnitte. Sie wurde eingesetzt, um Gene bzw. Genabschnitte nachzuweisen oder DNA-Fragmente für die gerichtete Mutagenese nach Datsenko & Wanner (3.4.7) herzustellen. Als DNA-Vorlage für die PCR dienten je nach Weiterverwendung Hitzelysate (2 μl) oder mittels Kit aufgereinigte DNA (100 ng in 2 μl). Für die PCR eingesetzte dNTP's (Roti-Mix PCR) wurden von Roth (Karlsruhe) und PCR-Puffer sowie MgCl_2 von Rapidozym (Berlin) bezogen. Bei jeder PCR wurden Positivkontrollen (Referenzstamm-DNA) und Leerwertkontrollen ($\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$) mitgeführt. Die DNA-Fragmente wurden bis zur weiteren Benutzung bei 4 °C gelagert.

Standard-PCR:

Der Reaktionsansatz für die Standard-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

	5,0 μl	PCR-Puffer (10x)
	2,5 μl	MgCl_2 (50 mM)
	5,0 μl	dNTPs (10 mM je Nukleotid)
	1,0 μl	je Primer (10 pmol)
	0,2 μl	DNA-Polymerase (5 units/ μl)
	2,0 μl	DNA
ad	50 μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{millipore}}$

Programmablauf:

1	Prädenaturierung	94 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Primeranlagerung	55 °C	1 min
4	Elongation	72 °C	1 min
Schritt 2 bis 4: 35 Zyklen			
5	Endelongation	72 °C	10 min

Multiplex-PCR nach Bosworth & Casey:

Die Multiplex-PCR nach Bosworth & Casey (1997) diente zum Nachweis der Fimbriengene *faeG* (F4-Fimbrien), *fanA* (F5-Fimbrien), *fasA* (F6-Fimbrien), *fedA* (F18ab- und F18ac-Fimbrien), *FimF41a* (F41-Fimbrien) und der Toxingene *est-Ia* (hitzestabiles Enterotoxin ST-Ia), *est-II* (hitzestabiles Enterotoxin ST-II), *eltB-Ip* (hitzelabile Enterotoxine LT-Ia und LT-Ib) und *stx2e* (Shigatoxin 2) bei *E. coli*.

Der Reaktionsansatz für die Multiplex-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

	3,0 µl	PCR-Puffer (10x)
	1,2 µl	MgCl ₂ (50 mM)
	0,4 µl	dNTPs (10 mM je Nukleotid)
	3,0 µl	Primermix I (5 pmol je Primer)
	3,0 µl	Primermix II (5 pmol je Primer)
	0,2 µl	DNA-Polymerase (5 units/µl)
	2,0 µl	DNA
ad	30 µl	H ₂ O _{millipore}

Primermix I: F-18-1, K88-1, K88-2, K99-1, K99-2, LT-1, P987-1, P987-2, STb-1

Primermix II: F-18-2, F41-1, F41-2, LT-2, StaP-1, StaP-2, STb-2, Stx2e-1, Stx2e-2

Programmablauf:

1	Prädenaturierung	94 °C	5 min
2	Denaturierung	94 °C	1 min
3	Primeranlagerung	55 °C	1 min
4	Elongation	72 °C	1 min
Schritt 2 bis 4: 30 Zyklen			
5	Endelongation	72 °C	10 min

3.4.5 Agarosegelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen sowie zur Abschätzung von Größe und Reinheit von Plasmid-DNA verwendet. Der Agarosegehalt variierte je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente zwischen 0,8 % und 1,2 %. Plasmide wurden in 0,8 % Agarosegelen aufgetrennt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 100 ml TBE durch Erhitzen auf 100 °C gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 65 °C wurden 1,3 µl Ethidiumbromidlösung (1 %) zugegeben, um die DNA-Banden nach der Auftrennung unter UV-Licht sichtbar machen zu können. Das Gel wurde in

einen Gelschlitten mit Probentaschenkamm gegossen und bis zum Erstarren bei Raumtemperatur stehen gelassen. 10 µl DNA-Probe wurde vor dem Auftragen mit 2,5 µl 5xLadepuffer gemischt. Als Größenstandard für PCR-Produkte wurde ein 100 bp-Marker aufgetragen. Für Plasmide wurde der Lambda Hind III-Marker verwendet. Die Trennung erfolgte bei konstanter Spannung (80-120 V) für 60-90 min. Zur Geldokumentation dienten ein UV-Transilluminator und ein Videoprintersystem.

TBE: 108 g/l TRIS, 55 g/l Borsäure, 20 mM EDTA (0,5 M Stammlösung, pH 8,0)
5xLadepuffer: 50 % Glycerin, 100 mM EDTA (0,5 M Stammlösung, pH 8,0), 1 mM TRIS-HCl (10 mM Stammlösung, pH 8,0), 0,025 % Bromphenolblau

3.4.6 Transformation von *E. coli*-Zellen

3.4.6.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Die Bakterien wurden über Nacht auf LB-Agar angezogen, in 6 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C bis zur spätlogarithmischen Phase (OD_{600} ca. 2,0) angezogen. Die Kultur wurde nochmals 1:500 in 50 ml LB-Medium in 250 ml-Erlenmeyerkolben verdünnt und die Bakterien bei 200 rpm und 37 °C bis zur OD_{600} 1,0 angezogen. Im Anschluss wurden die Bakterien bei 8000xg und 4 °C 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Arbeiten auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Alle benötigten Lösungen und Materialien wurden in gekühltem Zustand verwendet. Die Bakterien wurden mehrmals in 10 % Glycerin gewaschen (3x in 50 ml, 8000xg für 15 min; 2 in 50 ml, 4000xg für 10 min; 1x in 25 ml, 2000xg für 10 min). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, ca. 0,5 ml der Glycerinlösung im Reaktionsgefäß belassen und die Bakterien darin resuspendiert. Je 100 µl der nun elektrokompenten Zellen wurden in auf -80 °C vorgekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.4.6.2 Elektroporation

Die elektrokompenten Zellen (3.4.6.1) wurden auf Eis aufgetaut und mit 100-200 ng Plasmid-DNA für 1 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben, einem kurzen elektrischen Puls ausgesetzt (25 µF, 400 Ω, 2,5 kV) und sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden 5 bis 20

Kolonien mittels Plasmidaufarbeitung (3.4.1.2) oder PCR (3.4.4) auf eine erfolgreiche Transformation hin überprüft.

3.4.7 Mutagenese nach Datsenko & Wanner

Zur Herstellung isogener Mutanten des EcN-Wildtyps für die Gene *aroA* und *fliA* wurde die Methode nach Datsenko & Wanner (2000) angewendet. Es handelt sich hierbei um eine gerichtete Mutagenese, bei der mit Hilfe von λ -Red vermittelter Rekombination die DNA-Sequenz des Zielgens gegen ein Antibiotikaresistenzgen ausgetauscht wird. Die DNA-Sequenz, welche für das Antibiotikaresistenzgen kodiert, wird zuvor mittels PCR-Reaktion von einem Plasmid amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer weisen am 5'-Ende jeweils ca. 40 bp-große Homologien zu der flankierenden Sequenz des Zielgens auf. In den Bakterienstamm wird durch Elektroporation das Helferplasmid pKD46 eingebracht. Dieses enthält das Gen für die Red-Rekombinase des Bakteriophagen λ , welches unter der Kontrolle eines durch Arabinose induzierbaren Promotors steht. In die so transformierte Bakterienzelle wird im Anschluss ebenfalls durch Elektroporation das Antibiotikaresistenzgen mit den endständigen Homologien zu den flankierenden Sequenzen des Zielgens eingebracht. Mit Hilfe der λ -Red-Rekombinase wird dann die Sequenz des Zielgens zwischen den Homologien herausgenommen und an dessen Stelle die Sequenz für das Antibiotikaresistenzgen in das Genom integriert. Klone mit erfolgreicher Integration können im Anschluss auf antibiotikahaltigen Agarplatten selektiert werden und mittels spezifischer Primer auf Insertion des Resistenzgens und Deletion des Zielgens in der PCR überprüft werden. Da das Resistenzgen von FRT-Sites (*FLP Recognition Target*) flankiert ist, kann dieses im Anschluss an die Mutagenese durch Einbringen der FLP-Rekombinase in die Bakterienzelle über das Plasmid pCP20 wieder entfernt werden (Datsenko und Wanner, 2000).

Es erfolgte ein Austausch des Zielgens gegen das Kanamycinresistenzgen (*kan*). Als Vorlage für die PCR-Reaktion diente das Plasmid pKD4. Für die entsprechenden Zielgene stand die spezifische Sequenz für EcN nicht zur Verfügung, da das Genom von EcN bisher nur unvollständig sequenziert ist. Ein Vergleich der bisher bekannten Sequenzen zeigte große Homologien zum uropathogenen *E. coli*-Stamm CFT073 (Grozdanov et al., 2004; Sun et al., 2005). Homologe Sequenzen sowie Kontrollprimer der Zielgene wurden deshalb anhand der Genomsequenz des UPEC-Stammes CFT073 ausgewählt. Zum Amplifizieren der *kan*-Genkassette wurde die Standard-PCR eingesetzt (10 Reaktionsansätze, Gesamtvolumen 500 μ l) (3.4.4). Das DNA-Fragment wurde mittels Gelelektrophorese (3.4.5) überprüft und im Anschluss über das QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Aufgrund der begrenzten DNA-Bindungs-

kapazität wurden pro Säule 120 µl PCR-Produkt geladen und mit 50 µl H₂O_{millipore} eluiert. Die Eluate wurden vereint und zur weiteren Aufreinigung und Konzentration zweimal einer Ethanol-Natriumacetatfällung unterzogen (3.4.2). Nach der zweiten Fällung wurde das DNA-Fragment in 10 µl H₂O_{millipore} resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

In EcN wurde mit Hilfe der Elektroporation (3.4.6.2) das Helferplasmid pKD46 eingebracht, die transformierten Bakterien auf Amp-LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Der Klon EcN pKD46 wurde als Kryokultur verwahrt (3.1.3). Vom Klon EcN pKD46 wurden, wie in Kapitel 3.4.6.1 beschrieben, elektrokompente Zellen hergestellt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte jedoch aufgrund der Temperatursensitivität des Plasmids bei 28 °C. Die Vorkultur wurde bis zur OD₆₀₀ 0,6 angezogen, 1:20 in LB-Medium verdünnt und im Anschluss zum Induzieren der λ-Red-Rekombinase bei OD₆₀₀ 0,1 5 mM Arabinose zugegeben (Stammlösung 1 M). Die Bakterien wurden weiter bis zur OD₆₀₀ 1,0 angezogen und elektrokompent gemacht (3.4.6.1).

Zum Einbringen der *kan*-Genkassette mit den endständigen Homologien zum Zielgen in EcN pKD46 wurden 5 µl des aufgereinigten und hoch konzentrierten DNA-Fragmentes mittels Elektroporation in die Zellen eingebracht (3.4.6.2). Aufgrund der relativ niedrigen Transformationseffizienz wurden die Bakterien zur Adaptation und Ausbildung der Resistenz sowie zur Vermehrung nach der Resuspension in SOC-Medium zunächst über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie auf Km-LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Resistente Klone wurden mit Hilfe spezifischer Primer innerhalb der *kan*-Genkassette und außerhalb des Zielgens in der PCR-Reaktion auf eine erfolgreiche Deletion des Zielgens überprüft. Darüber hinaus wurden die Mutanten phänotypischen Tests unterzogen, EcN Δ*aroA* hinsichtlich des Wachstums bei Mangel von aromatischen Aminosäuren auf Glukose-Minimalagar und LB-Agar sowie in *aroAS*-Mangelmedium und AS-Medium, EcN Δ*flhA* hinsichtlich der Motilität auf LB-Weichagar.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Gewinnung sezernierter Proteine von EPEC aus Kulturüberständen

Der humane EPEC-Stamm E2348/69 wurde über Nacht auf LB-Agar angezogen, in 6 ml DMEM/HAM'S angeimpft und bei 200 rpm und 37 °C bis zur OD₆₀₀ ca. 1,0 angezogen. Im Anschluss wurde die Kultur nochmals 1:100 in 50 ml DMEM/HAM'S in 250 ml-Erlenmeyerkolben verdünnt. Um dabei den Übertrag von bereits sezernierten Proteinen zu verhindern, wurden die Bakterien vor dem Überimpfen 5 min bei 8000xg und Raumtemperatur zentrifugiert und in frischem DMEM/HAM'S resuspendiert. Die Kulturen

wurden bei 200 rpm und 37 °C möglichst exakt bis zur OD₆₀₀ 1,0 angezogen. 1 ml der Kultur wurden abgenommen und für die Aufarbeitung von Proteinen aus den Bakterien verwendet (3.5.2). 45 ml der Kultur wurden 15 min bei 8000xg und 4 °C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und sterilfiltriert (0,22 µm Porengröße). Bei Kulturen mit abweichender OD₆₀₀ wurde das Volumen entsprechend zurückgerechnet. Die sezernierten Proteine der Überstände wurden nach Zugabe von TCA (Endkonzentration 10 %) über Nacht bei 4 °C gefällt. Am nächsten Tag wurden die Überstände 30 min bei 10000xg und 4 °C zentrifugiert und das Proteinpellet 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde eine Acetonfällung durchgeführt, um restliches TCA, welches bei der weiteren Analyse der Proteine stören würde, zu entfernen und die Proteine zu konzentrieren. Dazu wurde das Proteinpellet in 1 ml 0,2 % SDS in 25 mM TRIS-HCl (pH 8,0) gelöst, 1:4 mit eiskaltem Aceton gemischt, in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 10000xg und 4 °C wurde das Proteinpellet 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 25 mM TRIS-HCl (pH 8,0) und 4 M Harnstoff aufgenommen. Dabei erfolgte im Vergleich zum Ausgangsvolumen des Kulturüberstandes eine 1000-fache Konzentration. Die Proteinlösungen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Um den Einfluss von EcN und MG1655 auf die Sezernierung von Proteinen durch E2348/69 zu untersuchen, wurde E2348/69 in Kulturüberständen dieser Stämme angezogen und wie beschrieben die Proteine aufgereinigt. Die Kulturüberstände wurden dabei in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (50 %, 75 %, 100 %). Die Gewinnung der Kulturüberstände erfolgte wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben. Es wurde jedoch FKS-freies DMEM/HAM'S-Medium verwendet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Kulturüberstände bei -20 °C aufbewahrt. Die pH-Werte wurden mit Hilfe des pH-Meters bestimmt. Eine Korrektur des pH-Wertes wurde durch Zugabe von 10 mM NaOH vorgenommen. Um zu überprüfen, ob EcN und MG1655 selbst Proteine in den Überstand sezernieren, wurden aus ihren Kulturüberständen analog zu E2348/69 ebenfalls die Proteine aufgereinigt.

3.5.2 Gewinnung von Proteinen aus EPEC-Bakterien

E2348/69 wurde bei 200 rpm und 37 °C in DMEM/HAM'S bzw. in Kulturüberständen von EcN und MG1655 bis zur OD₆₀₀ 1,0 angezogenen (3.5.1). 1 ml der Kultur wurde bei 8000xg und Raumtemperatur 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Bakterienpellet in 50 ml 4xProbenpuffer resuspendiert. Die Proteine wurden im Anschluss 5 min bei 99 °C denaturiert, kurz auf Eis gestellt, noch einmal für 5 s zentrifugiert und bei -20 °C aufbewahrt.

4xProbenpuffer: 1 M TRIS-HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 8 % β-Mercaptoethanol, 20 %
Glyzerin, 0,025 % Bromphenolblau

3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration sezernierter Proteine in einer Lösung wurde das Bio-Rad DC Protein Assay Kit verwendet, welches sich an die Methode von Lowry et al. (1951) anlehnt. Die Methode nutzt im Wesentlichen die Komplexbildung von Kupfer und Proteinen (Biuretreaktion), die nachfolgende Reduktion von Molybdat im Folin-Reagenz (Molybdänblaureaktion) und den dabei entstehenden Farbumschlag des Reagenz von gelb zu blau. Die Farbintensität ist der Proteinkonzentration proportional und wird als Extinktion photospektrometrisch erfasst. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung erfolgte in Doppelansätzen in 96-Loch-Mikrotiterplatten bei 750 nm am Fluorometer. Die Proteinmenge einer Probe, die der gemessenen Extinktion entsprach, wurde aus einer mit BSA erstellten Eichkurve errechnet (0,1-1,5 mg/ml).

3.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die Proteine wurden in der eindimensionalen, vertikalen SDS-Page nach Laemmli (1970) elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Das Polyacrylamidgel mit 0,75 mm Schichtdicke setzte sich aus einem 13,5 %igen Trenngel und einem 4 %igen Sammelgel zusammen. Die Gelelektrophoreseapparatur wurde nach Herstellerangaben aufgebaut. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses sofort mit 100 µl Butanol überschichtet, um einen geraden oberen Abschluss des Gels zu erreichen. Nach ca. 30 min war das Trenngel polymerisiert, das Butanol wurde abgenommen, der Zwischenraum der beiden Glasplatten mehrmals mit H_2O_{bidest} gespült und überschüssiges Wasser vorsichtig mit einem Papiertuch aufgesaugt. Im Anschluss wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet, der Probenkamm eingeschoben und das Sammelgel für ca. 10 min bei Raumtemperatur polymerisiert. Die Probentaschen wurden sorgfältig durch Spülen mit SDS-Laufpuffer von Gelresten befreit.

Zur Analyse sezernierter Proteine wurden die Proben 1:1 mit 4xProbenpuffer verdünnt. Als Bezugsgröße für die aufzutragende Gesamtproteinmenge dienten 10 µg (Silberfärbung) oder 3 µg (Westernblot) sezernierter Proteine von E2348/69 in DMEM/HAM'S. Für alle anderen Proben wurde entsprechend das gleiche Volumen verwendet. Da die Bakteriendichte der Proben vor der Aufreinigung der Proteine vereinheitlicht bzw. das Volumen der Kultur angepasst wurde, erfolgte so ein Vergleich sezernierter Proteinmengen für eine gleich bleibende Bakterienanzahl und nicht der Vergleich gleicher Proteinmengen. Proteinproben aus Bakterien wurden 1:1 mit H_2O_{bidest} verdünnt. Hier wurden jeweils 5 µl der Proben aufgetragen.

Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf das Sammelgel 5 min auf 99 °C erhitzt. Für die Größenabschätzung der Proteinbanden wurde der gefärbte Marker Prestained Protein

Standard low range mitgeführt (5 µl). Die Auftrennung erfolgte bei 30 mA über ca. 1,5 h in SDS-Laufpuffer. Anschließend wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für die Silberfärbung (3.5.5) oder den Westernblot (3.5.6) verwendet.

Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:

	Trenngel (13,5 %)	Sammelgel (4 %)
Polyacrylamid	4,5 ml	0,7 ml
H ₂ O _{bidest}	2,8 ml	3,0 ml
1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-
0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml
TEMED	5 µl	5 µl
SDS 10 %	100 µl	50 µl
Pyridin 5 % *	-	1 µl
APS 10 %	100 µl	50 µl

* Die Zugabe von Pyridin färbt das Sammelgel violett an und erleichtert das Erkennen der Probenaschen

SDS-Laufpuffer: 25 mM TRIS, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS

4xProbenpuffer: 1 M TRIS-HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 8 % β-Mercaptoethanol, 20 % Glyzerin, 0,025 % Bromphenolblau

3.5.5 Silberfärbung

Zur unspezifischen Detektion von Proteinen nach der SDS-Page (3.5.4) wurden die Gele mit Silber gefärbt. Das Prinzip der Silberfärbung beruht auf einer Komplexbildung von bestimmten Aminosäureresten (Asp-, Glu-, Cys-) der Proteine mit Ag⁺-Ionen (farblos), welche im Anschluss durch Formaldehyd zu Ag reduziert werden und dadurch bräunlich-schwarz erscheinen. Die Silberfärbung stellt einen sehr sensitiven Nachweis für Proteinbanden im ng-Bereich dar (Blum et al., 1987). Sie lässt aber keine Quantifizierung der Proteine zu, da diese je nach Aminosäurezusammensetzung mit unterschiedlicher Intensität angefärbt werden. Es wurde das Silver Stain Plus Kit verwendet, welches nach einer modifizierten Methode von Gottlieb & Chavko (1987) arbeitet. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Färbung wurde mit 5 % Essigsäure gestoppt und die Gele in H₂O_{bidest} aufbewahrt. Zur Dokumentation wurden die Gele nass in eine Klarsichtfolie gelegt und gescannt.

3.5.6 Westernblot

Mit Hilfe des Westernblots wurden die von EPEC sezernierten Proteine EspA, EspB und Tir mittels Antiseren nachgewiesen (Towbin et al., 1979). Die Antiseren wurden von James B. Kaper (University of Maryland, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um im Kaninchen generierte Antiseren gegen entsprechende Histidin-markierte (His-tag), rekombinante Fusionsproteine von EspA, EspB und Tir aus dem humanen EPEC-Stamm E2348/69.

3.5.6.1 Transfer auf eine Nitrozellulosemembran

Um Proteine nach der Größenaufftrennung in der SDS-Page für die spezifische Bindung von Antikörpern zugänglich zu machen, wurden die Proteine zunächst mit Hilfe des Tank-Blot-Verfahrens auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (0,2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen). Dazu wurden Gel und Membran im so genannten „Sandwich“-Aufbau (3x Filterpapier, Gel, Membran, 3x Filterpapier) luftblasenfrei aufeinander gelegt. Zuvor wurden Membran und Filterpapier auf die exakte Größe des Gels zugeschnitten, Gel und Membran 30 min in TBT-Puffer equilibriert und das Filterpapier kurz in TBT-Puffer getränkt. Der Transfer erfolgte über 1,5 h durch Anlegen eines elektrischen Feldes (100 V, 350 mA) senkrecht zur Größenaufftrennung der Proteine bei 4 °C unter ständigem Rühren in TBT-Puffer. Um die Effizienz des Proteinübertrages zu beurteilen, wurden die Proteinbanden reversibel mit Ponceau S angefärbt. Dazu wurde die Membran 5 min in Ponceau-Lösung geschwenkt, danach kurz in H₂O_{bidest} gewaschen und einzelne Banden differenziert. Durch mehrmaliges Waschen in H₂O_{bidest} wurde die Membran vollständig entfärbt. Direkt danach schloss sich die Immunomarkierung an (3.5.6.2).

Towbin-Transfer-Puffer (TBT): 25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

Ponceau-Lösung: 0,5 % Ponceau S, 5 % Essigsäure, 10 % Methanol

3.5.6.2 Immunomarkierung

Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden unter leichtem Schwenken der Membran auf einer Wippe statt. Die Membran wurde 10 min in TBS-Puffer gewaschen und im Anschluss 1 h in Blockpuffer inkubiert, um freie, unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Danach wurde sie über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantiseren inkubiert. Es wurde ein Gemisch aus Anti-EspA, Anti-EspB und Anti-Tir verwendet, da die nachzuweisenden Proteine unterschiedliche Molekulargrößen aufwiesen (EspA: 25 kDa, EspB: 37 kDa, Tir: 78 kDa). Zwar zeigten die Antiseren Kreuzreaktionen mit anderen sezernierten Proteinen,

Kreuzreaktionen für EspA, EspB und Tir traten jedoch nicht auf. Überschüssige Primärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen in TBS-Puffer für jeweils 10 min bei Raumtemperatur entfernt. Nachfolgend wurde die Membran für 1 h mit dem Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG-HRP bei Raumtemperatur inkubiert. Wie zuvor wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen entfernt. Das an die Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) ermöglichte die Detektion der Proteinbanden durch Chemilumineszenz (3.5.6.3).

Blockpuffer:	5 % Magermilchpulver in TBS-Puffer
TBS-Puffer:	500 mM NaCl, 20 mM TRIS-HCl (pH 7,5)
Primärantikörper:	1:5000 Anti-EspA in Blockpuffer 1:5000 Anti-EspB in Blockpuffer 1:5000 Anti-Tir in Blockpuffer
Sekundärantikörper:	1:2000 Anti-Kaninchen-IgG-HRP in Blockpuffer

3.5.6.3 Enhanced Chemilumineszenz (ECL)

Die Visualisierung der durch Antikörper nachgewiesenen Proteinbanden im Blot erfolgte durch Chemilumineszenz. Bei dieser Nachweismethode bindet das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Peroxidase Luminol und katalysiert dessen Oxidation bei Anwesenheit des sehr starken Reduktionsmittels Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die bei dieser chemischen Reaktion kurzzeitig freigesetzte Energie wird in Form von Licht emittiert (Chemilumineszenz), was durch Auflegen eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann. Die Reaktion wird durch Coumarsäure verstärkt (Enhancer). Die Intensität des emittierten Lichtes (schwarzes Signal auf Röntgenfilm) ist proportional der Antigenmenge (Proteinmenge), wodurch sich die Proteinproben relativ zu einander qualitativ und quantitativ vergleichen lassen.

Alle Arbeiten wurden in der Dunkelkammer bei Rotlicht durchgeführt. Der Blot wurde für 2 min gleichmäßig mit der frisch hergestellten ECL-Lösung bedeckt, faltenfrei in herkömmlicher Frischhaltefolie eingepackt und für 1 min ein Röntgenfilm aufgelegt. Der Film wurde anschließend 3 min in Kodak LX24 Entwickler (1:4, Sigma-Aldrich, München) entwickelt, 1 min gewässert und 3 min in Kodak X-Ray Fixierer AL4 (1:4, Sigma-Aldrich, München) fixiert. Nach sorgfältigem Spülen mit H_2O_{bidest} wurde der Film an der Luft getrocknet und zur Dokumentation gescannt.

ECL-Lösung:	4 ml Lösung A, 1,2 μ l H_2O_2 (30 %), 400 μ l Lösung B
Lösung A:	0,1 M TRIS-HCl (pH 8,6), 0,25 g/l Luminol lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C

Lösung B: 1,1 g/l Coumarsäure in Dimethylsulfoxid (DMSO)
Lagerung bei Raumtemperatur

3.6 Statistische Methoden

Die Daten aus Adhäsions- und Infektionsstudien wurden, soweit nicht anders angegeben, aus mindestens 3 unabhängigen Tests mit je einem Doppel- oder Dreifachansatz erhoben und als Mittelwerte aus den 3 Tests oder eines repräsentativen Einzeltests angegeben. Die graphische Darstellung in Balken- und Liniendiagrammen erfolgte mit dem Programm SigmaPlot 10.0 (SYSTAT Software, Erkrath). Die statistische Auswertung der Daten sowie die Darstellung von Boxplotdiagrammen erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, USA). Signifikante Unterschiede von Daten wurden bei Vorliegen einer Normalverteilung im Students-T-Test für eine oder zwei unabhängige Stichproben und bei fehlender Normalverteilung im Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben überprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) wurde als signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl und Charakterisierung der eingesetzten Stämme

In einem in vitro-Modell mit der porcinen intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2 wurde der Effekt des probiotischen *E. coli* Nissle 1917 (EcN) auf die Infektion mit atypischen enteropathogenen *E. coli* (aEPEC) untersucht. Als porciner aEPEC-Stamm wurde P2005/03 ausgewählt. Der nicht pathogene *E. coli* K-12-Stamm MG1655 (Laborstamm), der aus dem Schweinedarm isolierte *E. coli*-Stamm IMT13962 und der probiotische *E. faecium*-Stamm SF68 wurden als Vergleichsstämme zu EcN eingesetzt. Für alle Stämme wurden zunächst einzeln Adhäsions- bzw. Infektionsraten bestimmt (3.2.5, 3.2.6) und somit der jeweilige Phänotyp in der Zellkultur charakterisiert. Mit Hilfe von Epifluoreszenzmikroskopie (3.3.1), konfokaler Laserscanningmikroskopie (3.3.1) und Rasterelektronenmikroskopie (3.3.2) wurden Adhäsions- bzw. Infektionsmuster und charakteristische Veränderungen der Epithelzellen ermittelt. Die bisher nicht bzw. nur wenig charakterisierten Stämme P2005/03 und IMT13962 wurden zusätzlich genotypisch auf das Vorhandensein bestimmter Virulenzmerkmale überprüft, um sie hinsichtlich Pathogenität bzw. Pathotyp einordnen zu können.

4.1.1 *E. coli* Nissle 1917 (EcN)

EcN zeichnete sich durch eine starke Adhärenz an IPEC-J2 aus. Bei Verwendung einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 100 hefteten nach 2 h Inkubation im Durchschnitt 20 Bakterien pro Epithelzelle an (Abb. 6).

Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop verdeutlichten, dass die Bakterien gleichmäßig verstreut und anscheinend mit Hilfe von Fimbrien auf der Epithelzelloberfläche adhärten. Zusätzlich bildeten die Bakterien untereinander ein filamentartiges Netzwerk aus, wobei sich die einzelnen Filamente in ihrer Länge deutlich von Fimbrien unterschieden (Abb. 5). Es zeigte sich, dass diese Filamente in erster Linie Verbindungen zwischen den Bakterien darstellten und seltener eng mit der Epithelzelloberfläche assoziiert waren.

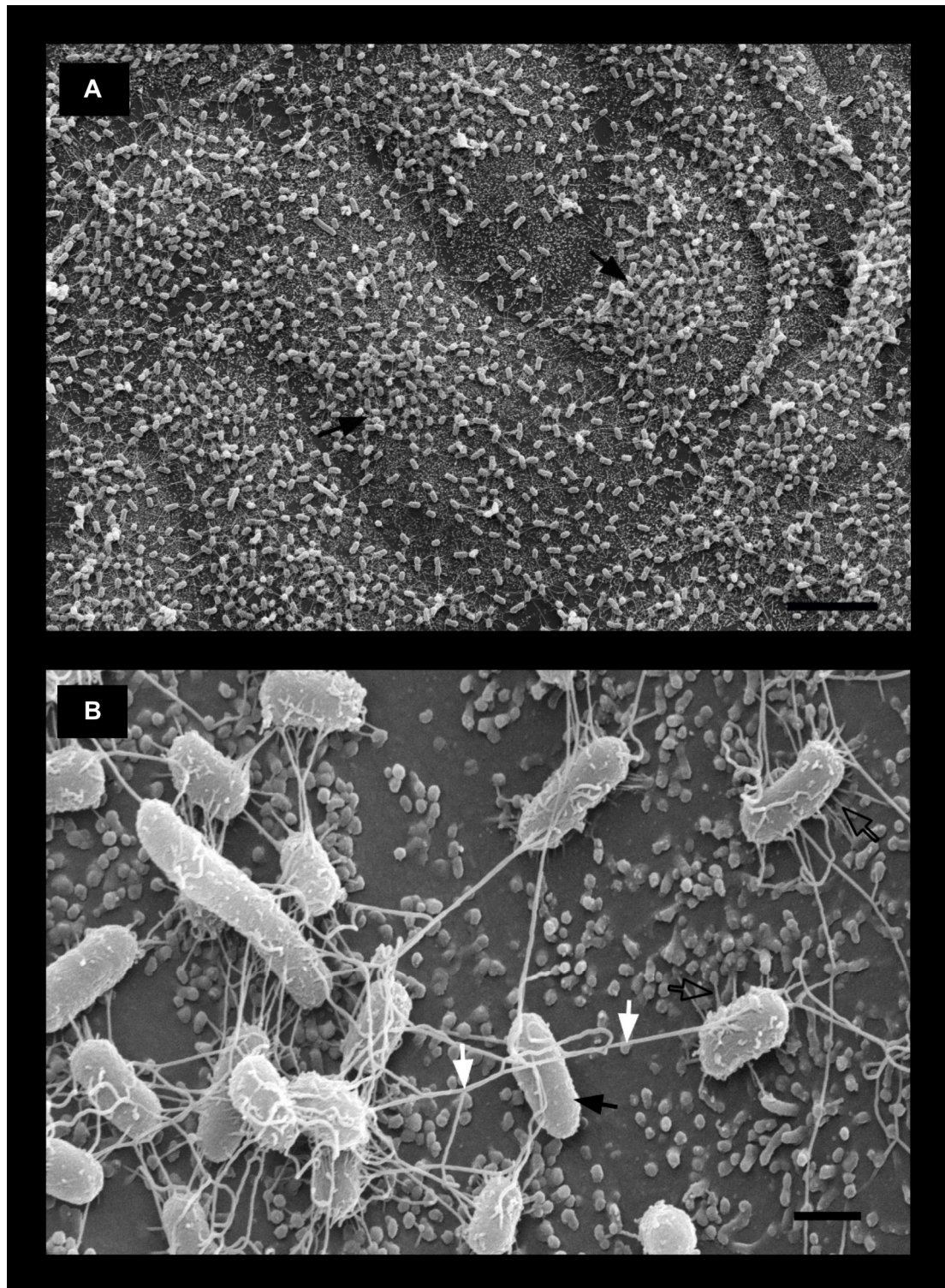


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von EcN an IPEC-J2

Die Inkubation auf IPEC-J2 erfolgte mit MOI 100 für 4 h bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Bakterien (schwarze Pfeile) adhärirten gleichmäßig verstreut mit Hilfe von Fimbrien (schwarz umrandete Pfeile) und bildeten zusätzlich ein filamentartiges Netzwerk aus (weiße Pfeile). A: Maßstab 10 µm, B: Maßstab 1 µm

4.1.2 Vergleichsstämme: SF68, MG1655, IMT13962

E. faecium SF68

Um die Wirkung von EcN auf die aEPEC-Infektion mit einer anderen probiotischen Bakterienspezies vergleichen zu können, wurde der *E. faecium*-Stamm SF68 (NCIMB 10415) in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Wahl des Stammes begründete sich darin, dass die vorliegende Arbeit Teil des DFG-Projektes FOR 438 „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“ am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin war. In dessen Rahmen wurden in vivo Effekte der Probiotika *B. cereus* var. Toyoi and *E. faecium* SF68 auf Leistungsparameter und Gesundheit von Sauen und Ferkeln untersucht. Zusätzlich wurden Zellkultursysteme zur Beschreibung möglicher Einflüsse auf ausgewählte pathogene Bakterien genutzt. Da *B. cereus* var. Toyoi aufgrund seiner hämolysierenden Eigenschaft nicht in der Zellkultur eingesetzt werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit nur mit *E. faecium* SF68 gearbeitet.

E. coli K-12 MG1655

Der *E. coli* K-12-Stamm MG1655 ist biochemisch, physiologisch und genetisch sehr gut charakterisiert, vollständig sequenzanalysiert und nicht pathogen (Blattner et al., 1997; Neidhardt, 1987). Er wurde deshalb als nicht probiotischer Vergleichsstamm ausgewählt.

E. coli IMT13962

Es sollte ein porcines *E. coli*-Darmisolat gefunden werden, welches annähernd so gut adhärent an IPEC-J2 ist wie EcN. Dazu wurden aus dem Jejunum und Colon von drei verschiedenen, klinisch gesunden Tieren insgesamt 120 an Mukus oder Epithelzellen adhärente *E. coli*-Isolate gewonnen (3.1.5) und im Adhäsionstest (3.2.5) hinsichtlich ihres Adhäsionsvermögens an IPEC-J2 überprüft. Vier dieser Isolate adhärten in etwa gleich stark wie EcN. Wie sich bei der weiteren geno- und phänotypischen Charakterisierung herausstellte, waren diese mit EcN identisch (Kleta et al., 2006). Sie waren daher als Vergleichsstämme ungeeignet. Das Isolat IMT13962 erwies sich als einziges weiteres als gut adhärent. Die Genotypisierung mittels PCR (3.4.4) zeigte weder EPEC- oder EHEC-spezifische Virulenzgene noch das Gen *paa* (*porcine A/E associated gene*). Es wurde das Gen für das hitzestabile Toxin ST-II nachgewiesen. Der Stamm wies jedoch keine Gene für vorrangig mit ETEC assoziierten Fimbrientypen auf (Tab. 9). Die Serotypisierung zeigte keine Antigene für Flagellen (O15:n.t.). Im Schwärmagartest (3.1.7) erwies sich der Stamm jedoch als sehr motil. IMT13962 besaß auf Blutagarplatten keine hämolysierenden Eigenschaften. Obwohl IMT13962 die genetische Determinante für das hitzestabile Toxin ST-II trug, wurde der Stamm aufgrund seiner guten Adhärenz an IPEC-J2 als Vergleichsstamm zu EcN ausgewählt.

Tab. 9: Genotypisierung des porcinen *E. coli* IMT13962 mittels PCR

Gen	Nachweis von		Gen	Nachweis von	
<u>Attaching and Effacing</u>			<u>Adhäsine</u>		
<i>eae</i>	Intimin	-	<i>crlA</i>	Curli	+
			<i>faeG</i>	F4-Fimbrien	-
			<i>fanA</i>	F5-Fimbrien	-
<u>Toxine</u>			<i>fasA</i>	F6-Fimbrien	-
<i>astA</i>	hitze stabiles Toxin EAST1	-	<i>fedA</i>	F18ab-/F18ac-Fimbrien	-
<i>eltB-lp</i>	hitze labiles Toxin LT	-	<i>fimC</i>	Typ 1-Fimbrien	+
<i>est-Ia</i>	hitze stabiles Toxin ST-Ia	-	<i>fimf41a</i>	F41-Fimbrien	-
<i>est-II</i>	hitze stabiles Toxin ST-II	+	<i>papC</i>	P-Fimbrien	-
<i>stx1</i>	Shigatoxin 1	-	<i>sfa / foc</i>	S-Fimbrien / F1C-Fimbrien	-
<i>stx2</i>	Shigatoxin 2	-	<i>paa</i>	porcine A/E associated gene	-

+ Gen vorhanden, - Gen nicht vorhanden

4.1.3 Adhäsion von EcN und den Vergleichsstämmen an IPEC-J2

EcN hob sich hinsichtlich seiner sehr guten Adhäsion an IPEC-J2 deutlich von den Vergleichsstämmen ab (Abb. 6, Abb. 7). Im Adhäsionstest über 2 h mit MOI 100 war EcN ca. 130- bzw. 400-fach stärker adhären als SF68 und MG1655 (20 Bakterien/Zelle vs. 0,05 bzw. 0,15 Bakterien/Zelle) ($p=0,015$). IMT13962 war besser adhären als MG1655 und SF68 (ca. 3 Bakterien/Zelle), jedoch ca. 7-fach geringer als EcN ($p=0,027$). Die Adhäsionsfähigkeit der Stämme an IPEC-J2 stellte damit ein wesentliches Unterscheidungskriterium dar.

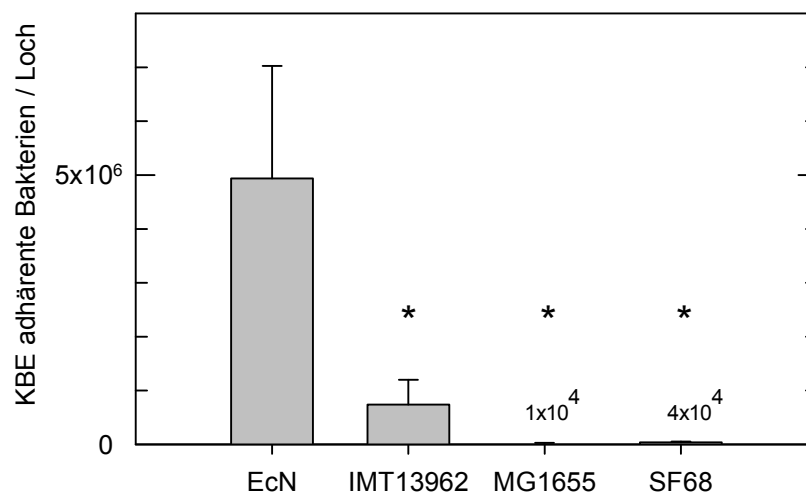


Abb. 6: Adhäsionsstärke von EcN und Vergleichsstämmen an IPEC-J2 nach 2 h

Die Stämme wurden für 2 h auf IPEC-J2 mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS inkubiert (12-Loch-Zellkulturplatten). Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. KBE: koloniebildende Einheiten, * $p \leq 0,05$ vs. EcN

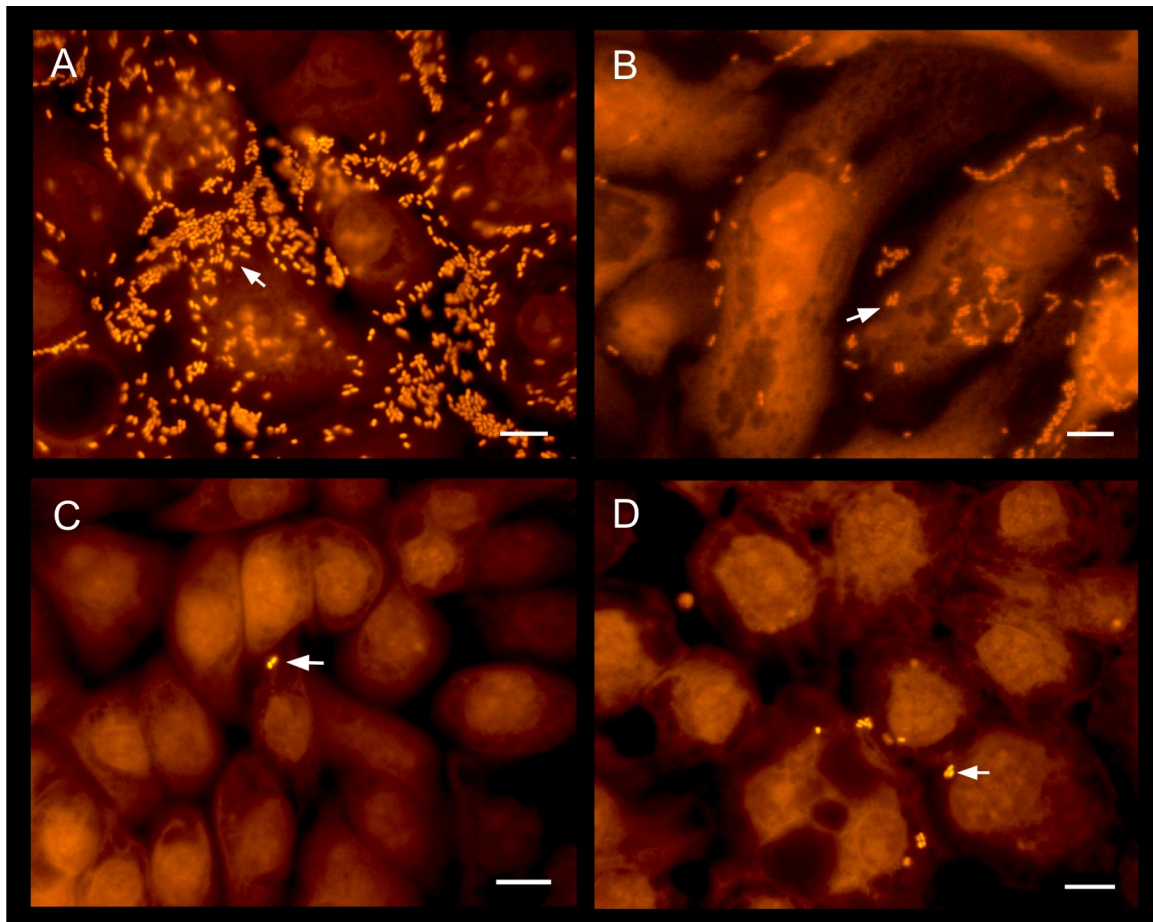


Abb. 7: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EcN und Vergleichsstämmen an IPEC-J2 nach 2h

IPEC-J2-Zellen wurden für 2 h mit EcN (A), IMT13962 (B), MG1655 (C) oder SF68 (D) inkubiert (MOI 100, 37 °C, DMEM/HAM'S-FKS). Zellkerne und Bakterien wurden mittels DNA-Färbung durch Propidiumiodid visualisiert. Weiße Pfeile kennzeichnen Bakterien. Maßstab 10 µm

4.1.4 Porciner aEPEC P2005/03

Der *E. coli*-Stamm P2005/03 wurde ursprünglich aus einem an Diarrhö erkrankten Ferkel isoliert und als EPEC-Stamm identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Stamm nochmals detailliert auf geno- und phänotypische Virulenzmerkmale für EPEC überprüft.

Die *E. coli*-Pathotypen EPEC und EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) bilden auf Epithelzellen sogenannte *Attaching and Effacing*-Läsionen (A/E-Läsionen) und lassen sich dadurch sehr gut von anderen *E. coli*-Pathotypen unterscheiden. Charakteristisch für A/E-Läsionen ist die sehr enge Anheftung der Bakterien an die Epithelzelloberfläche, die einher geht mit der Reorganisation des Wirtszytoskeletts und zur Bildung podestartiger Strukturen unterhalb der Anheftungsstelle der Bakterien führt (*Attaching*). In unmittelbarer Umgebung der bakteriellen Adhäsion werden die Mikrovilli zerstört (*Effacing*) (siehe Kapitel 1.3).

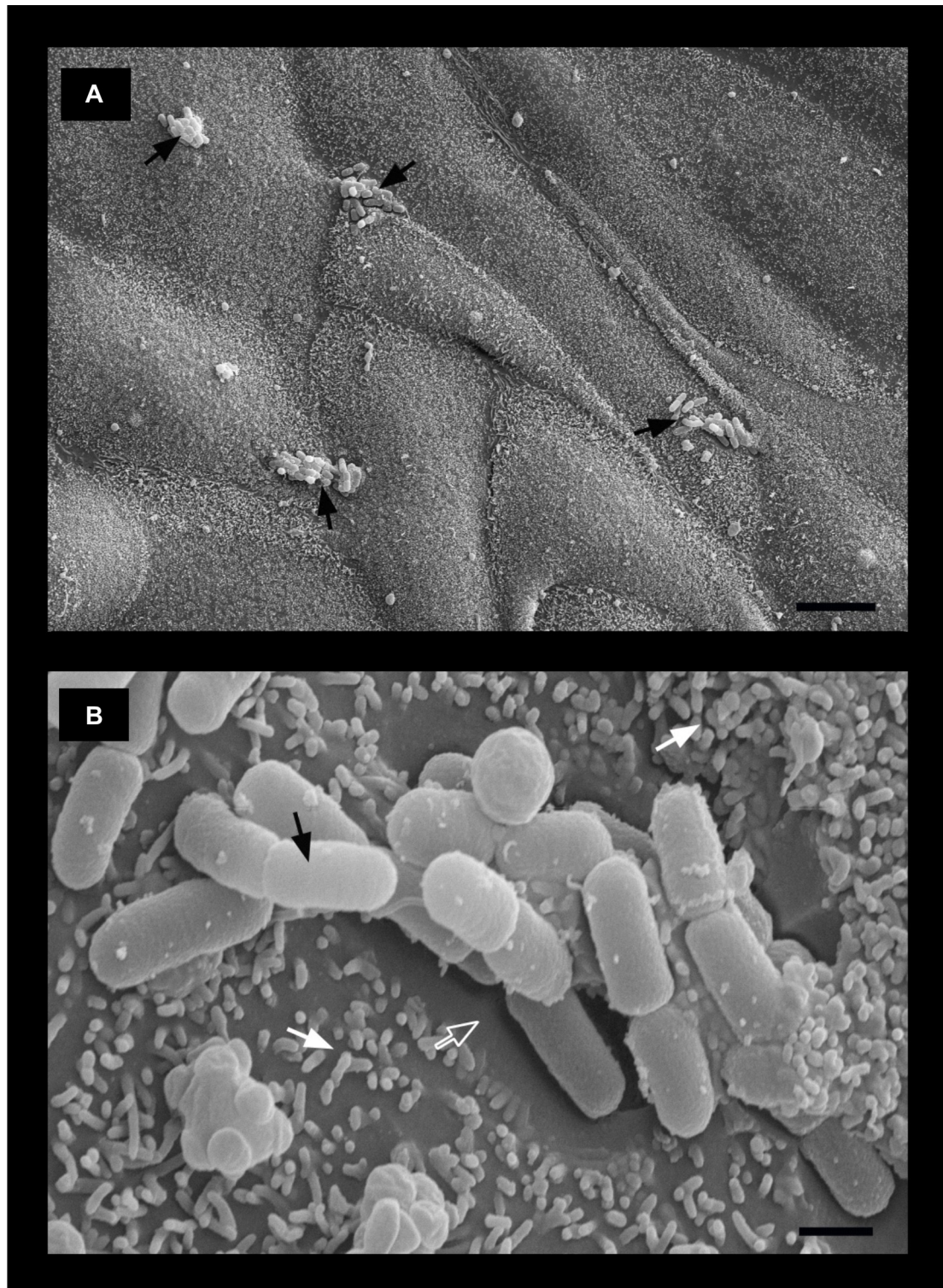


Abb. 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2

Die Infektion von IPEC-J2 mit P2005/03 erfolgte für 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Bakterien adhärirten lokal begrenzt in Mikrokolonien (schwarze Pfeile). Die auf der Epithelzelloberfläche ausgebildeten Mikrovilli (weiße Pfeile) wurden im Bereich der Anheftungsstelle der Bakterien zerstört (weiß umrandeter Pfeil). A: Maßstab 10 µm, B: Maßstab 1 µm

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 8 zeigen, dass P2005/03 nach 6 h Infektion lokal begrenzt in kompakten Mikrokolonien auf IPEC-J2 adhäre (Localized Adherence Pattern; Ausschnitt A). Die sehr enge Bindung der Bakterien an die Zelloberfläche und die Zerstörung der Mikrovilli in unmittelbarer Umgebung adhärenter Bakterien wiesen auf die Bildung von A/E-Läsionen hin (Abb. 8, Ausschnitt B). Mit Hilfe des FAS-Tests (3.3.1.3) wurde durch Anfärben des Zytoskelettproteins Aktin mit fluoreszierendem FITC-Phalloidin die mit der Bildung von A/E-Läsionen einhergehende Reorganisation des Wirtszytoskeletts nachgewiesen. FAS-positive Stämme zeigen dabei grüne, intensiv fluoreszierende Bereiche unterhalb der Anheftungsstelle der Bakterien. P2005/03 erwies sich hierbei als FAS-positiv (Abb. 9).

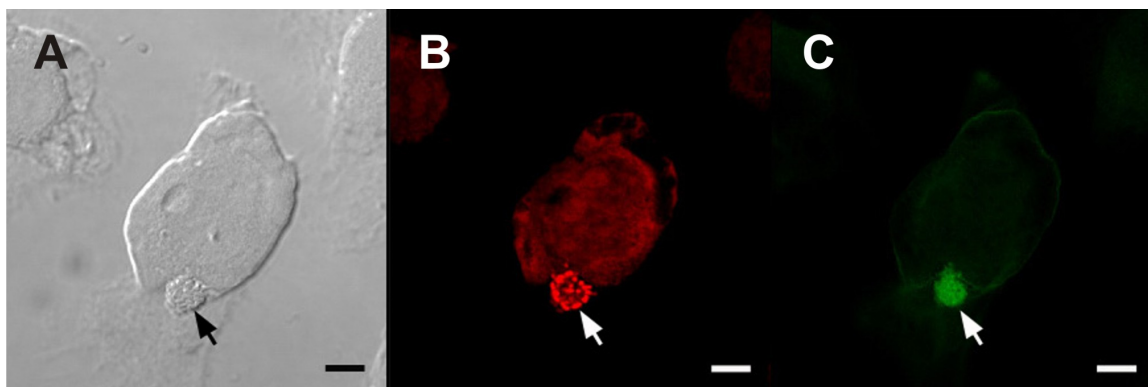


Abb. 9: Konfokale Laserscanningmikroskopische Aufnahme von P2005/03 an IPEC-J2: FAS-Nachweis

Die Infektion von IPEC-J2 mit P2005/03 erfolgte für 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Abbildung zeigt eine infizierte IPEC-J2-Zelle im differentiellen Interferenzkontrast (A), nach DNA-Färbung mit Propidiumiodid zur Visualisierung von Zellkern und Bakterien (B) sowie nach Aktinfärbung mit FITC-Phalloidin = FAS-Test (C). Pfeile kennzeichnen die Mikrokolonie bzw. den FAS-positiven Bereich unterhalb der Mikrokolonie. Maßstab 10 µm

Wichtige Virulenzgene für die Ausbildung von A/E-Läsionen sind auf der Pathogenitätsinsel LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) lokalisiert. Zusätzlich zum phänotypischen Nachweis erfolgte deshalb der Nachweis des LEE durch die Gene *lerA* (*LEE encoded regulator*) und *eae* (*E. coli attaching and effacing*, kodiert für das Adhäsin Intimin). In P2005/03 sind beide Gene enthalten (Tab. 10). Der Stamm besitzt den Intimintyp β . Der LEE ist dabei in den Genlocus *pheV* (Phenylalanin-spezifisches tRNA-Gen) inseriert, wobei neben *pheV* auch der Genlocus *pheU* zerstört ist. Der Genlocus *sefC* (Selenocystein-spezifisches tRNA-Gen) ist hingegen intakt (Jörg Jores, IMT, FU Berlin). P2005/03 gehört damit zur klonalen Linie EPEC2.

Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zwischen EPEC und EHEC ist die Bildung von Shigatoxinen durch EHEC. Für eine klare Abgrenzung zu EHEC wurde P2005/03 deshalb auf das Vorhandensein der Shigatoxingene *stx1* und *stx2* überprüft. Die Gene sind im Stamm nicht vorhanden. Darüber hinaus erwies er sich als negativ für die mit ETEC assoziierten Enterotoxingene *est-Ia* (hitze stabiles Toxin ST-Ia), *est-II* (hitze stabiles Toxin ST-II), *eltB-Ip* (hitze labiles Toxin LT) und *astA* (hitze stabiles Toxin EAST1).

Ebenfalls nützlich bei der Unterscheidung von *E. coli*-Pathotypen ist der Nachweis bestimmter Fimbrientypen. Enterotoxische (ETEC) und extraintestinale (ExPEC) *E. coli* sind häufig assoziiert mit der Bildung von P-, S-, F1C-, F4-, F5-, F6-, F18ab-, F18ac- und/oder F41-Fimbrien. P2005/03 weist keine Gene für diese Fimbrientypen auf. Es konnten aber Gene für Typ 1-Fimbrien (*fimC*) und Curli (*crlA*) nachgewiesen werden. Die Bildung von Curli wurde zudem auf Kongorot-Agarplatten (3.1.8) bestätigt. Das Gen *paa* (*porcine A/E associated gene*) ist in P2005/03 nicht vorhanden.

Typische EPEC bilden Typ IV-Fimbrien, sogenannte *Bundle Forming Pili* (BFP). Die genetische Determinate für BFP (*bfp*-Operon) ist auf dem ca. 69 kb großen EAF-Plasmid (*EPEC Adherence Factor Plasmid*) kodiert. Atypische EPEC (aEPEC) besitzen dieses Plasmid nicht (siehe Kapitel 1.3.1). Um P2005/03 als EPEC oder aEPEC einstufen zu können, wurde zunächst eine Plasmidaufarbeitung (3.4.1.2) durchgeführt. Der Stamm weist neben einem ca. 5-6 kb großem Plasmid ein weiteres Plasmid mit hoher Molekularmasse auf (siehe Abb. 10 A). Mit Hilfe spezifischer Primer wurde überprüft, ob es sich hierbei um das EAF-Plasmid handelt. Ein für das EAF-Plasmid spezifischer, 397 bp großer Sequenzabschnitt konnte nicht nachgewiesen werden. Der Stamm wies weder das Gen *bfpA* zum Nachweis von BFP (Abb. 10 B) noch das Gen *perA* (*Plasmid encoded regulator*) auf, welches ebenfalls auf dem EAF-Plasmid lokalisiert ist. Darüberhinaus zeigten die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen des Stammes nach Infektion von IPEC-J2 keine Bildung von BFP (Abb. 8). P2005/03 wurde deshalb als aEPEC eingestuft.

P2005/03 erwies sich auf Weichagarplatten (3.1.7) als motil. Der Stamm weist den Serotyp O108:H9 auf (P. Steinrück, Nationales Referenzlabor für *E. coli*, BfR, Berlin). Im Rahmen des *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) wurde der Stamm dem Sequenztyp 302 (*adhA*: 79, *fumC*: 84, *gyrB*: 71, *icd*: 78, *mdh*: 52, *purA*: 57, *recA*: 2) zugeordnet (Arbeitsgruppe M. Achtmann, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin). P2005/03 zeigte auf Blutagarplatten (3.1.9) keine Hämolyse.

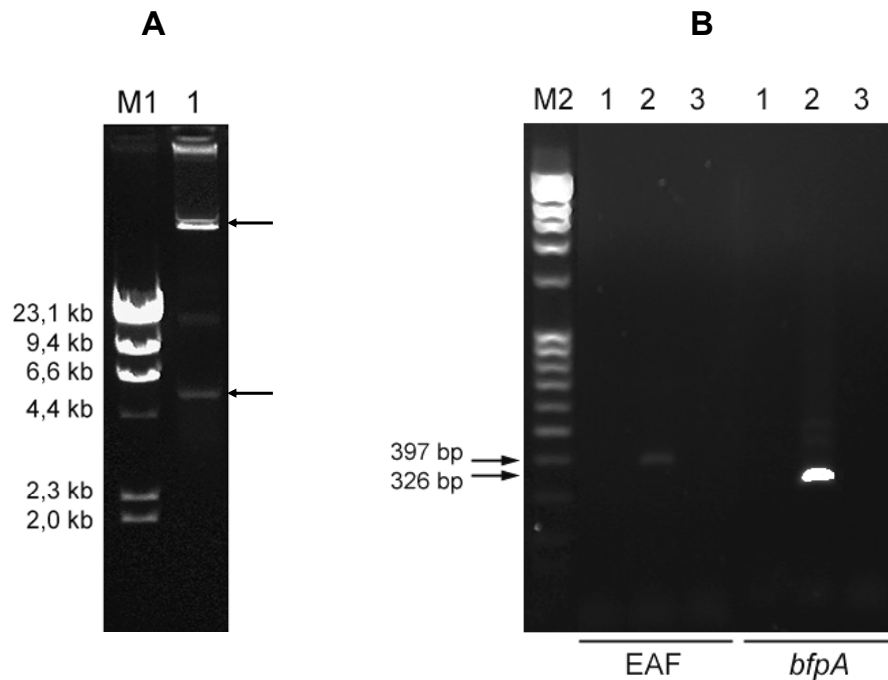


Abb. 10: Überprüfung von P2005/03 auf das Vorhandensein von EAF-Plasmid und BFP

Der Nachweis erfolgte mittels Plasmidpräparation (A) und PCR (B). Die EAF-spezifische Sequenz (397 bp) und der *bfpA*-Sequenzabschnitt (326 bp) wurde mit Hilfe der Oligonukleotidpaare F-EAF FP/F-EAF RP bzw. *bfp* FP/*bpf* RP amplifiziert. Die Größenauftrennung der Plasmidpräparation und der Amplifikate erfolgte im 0,8 bzw. 1,2 %igen Agarosegel. Spur 1: P2005/03; Spur 2: E2348/69; Spur 3: H₂O_{millipore}; M1: Lambda Hind III Marker; M2: 100 bp-DNA-Leiter extended

Durch Krause et al. (2005) und Malik et al. (2006) wurde nachgewiesen, dass in Absetzferkeln aus Deutschland und Ungarn der überwiegende Teil der isolierten EPEC-Stämme atypisch ist und der Serotyp O108:H9 einer der domierenden Serotypen darstellt. Der aEPEC-Stamm P2005/03 (O108:H9) war daher sehr gut als Prototyp für die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen in vitro-Untersuchungen zur Wirkung von EcN auf die aEPEC-Infektion im Schwein geeignet.

Tab. 10: PCR-Ergebnisse zur Bestimmung des *E. coli*-Pathotyps von P2005/03

Gen	Beschreibung	PCR-Ergebnis
<u>Attaching and Effacing</u>		
<i>eae</i>	Intimin	+
	Intimintyp β	+
<i>lerA</i>	<i>LEE encoded regulator</i>	+
<i>lifA/efa1</i>	<i>Lymphocyte inhibitory factor A/EHEC factor for adherence</i>	nur C-terminal (verkürzt) ¹
	LEE Insertion ²	pheV
<i>pheV</i>	Phenylalanin-spezifisches tRNA-Gen V	zerstört ³
<i>pheU</i>	Phenylalanin-spezifisches tRNA-Gen U	zerstört ³
<i>selC</i>	Selenocystein-spezifisches rRNA-Gen C	intakt ³
<u>EAF-Plasmid, BFP</u>		
EAF	EAF-Plasmid	-
<i>perA</i>	<i>Plasmid encoded regulator</i>	-
<i>bfpA</i>	<i>Bundle Forming Pili (BFP)</i>	-
<u>Toxine</u>		
<i>astA</i>	hitze stabiles Toxin EAST1	-
<i>eltB-lp</i>	hitze labiles Toxin LT	-
<i>est-Ia</i>	hitze stabiles Toxin ST-Ia	-
<i>est-II</i>	hitze stabiles Toxin ST-II	-
<i>stx1</i>	Shigatoxin 1	-
<i>stx2</i>	Shigatoxin 2	-
<u>Adhäsine</u>		
<i>crlA</i>	Curli-Fimbrien	+
<i>faeG</i>	F4-Fimbrien	-
<i>fanA</i>	F5-Fimbrien	-
<i>fasA</i>	F6-Fimbrien	-
<i>fedA</i>	F18ab-/F18ac-Fimbrien	-
<i>fimC</i>	Typ 1-Fimbrien	+
<i>fimf41a</i>	F41-Fimbrien	-
<i>papC</i>	P-Fimbrien	-
<i>sfa / foc</i>	S-Fimbrien / F1C-Fimbrien	-
<i>paa</i>	<i>porcine A/E associated gene</i>	-

(+) PCR-Amplifikat = Gen vorhanden, (-) kein PCR-Amplifikat = Gen nicht vorhanden; ¹ Nachweis *lifA/efa1* 5'-Ende mit Primerpaar *lifA3/lifA4* (+), 3'-Ende mit Primerpaar *lifA1/lifA2* (-) nach Jores et al. (2005). (+) PCR-Amplifikat, (-) kein PCR-Amplifikat, Gen am 3'-Ende verkürzt; ² Überprüfung auf Insertion des LEE in die t-RNA-Genloci *pheV*, *pheU* und *selC* nach Mc Daniel et al. (1995) und Rumer et al. (2003) mittels nachfolgender Primerpaare, *pheV*: 1484c308/4945PVc (+), *pheU*: 1484c308/cycZ1 (-), *selC*: K295/K296 (-) und K255/K260 (-). (+) PCR-Amplifikat = Insertion, (-) kein PCR-Amplifikat = keine Insertion. ³ Überprüfung der Integrität der Genloci mittels nachfolgender Primerpaare, *pheV*: 6229PVr/4945PVd (-), *pheU*: cadC2/cycZ1 (-), *selC*: K295/K260 (+) und K261/K260 (+). (+) PCR-Amplifikat = Genlocus intakt, (-) kein PCR-Amplifikat = Genlocus zerstört.

4.2 Effekte von EcN auf die aEPEC-Infektion von IPEC-J2

Der Einfluss von EcN auf die aEPEC-Infektion wurde im Infektionstest (3.2.6) durch Vorinkubation (Applikation 2 h vor Infektion), durch Koinkubation (Applikation zeitgleich zur Infektion) und durch Nachinkubation (Applikation 1 h nach Beginn der Infektion) untersucht. Die zeitlich unterschiedliche Applikation von EcN richtete sich dabei nach einer möglichen in vivo-Anwendung von EcN, bei der der Stamm präventiv oder auch kurativ appliziert werden kann. In dem in dieser Arbeit verwendeten in vitro-Modell ergaben sich daraus folgende Konsequenzen für die aEPEC-Infektion: Mit der Vorinkubation wurde aufgrund der sehr guten Adhärenz von EcN dessen Etablierung auf den Epithelzellen vor der aEPEC-Infektion und ein weiteres Wachstum von EcN während der aEPEC-Infektion erzielt. Die Koinkubation bot beiden Stämmen gleiche Ausgangsbedingungen. Bei der Nachinkubation hingegen konnte sich der aEPEC-Stamm zuerst auf den Epithelzellen etablieren. Die Stämme IMT13962, MG1655 und SF68 unterschieden sich von EcN darin, dass sie deutlich weniger adhären an IPEC-J2 waren. Daraus resultierte, dass nach Vorinkubation zu Infektionsbeginn eine geringere Bakterienanzahl an den Epithelzellen anhaftete und sich diese Stämme während der aEPEC-Infektion dementsprechend weniger vermehrten als EcN.

4.2.1 Einfluss von EcN auf die aEPEC-Infektionsrate

Der Einfluss von EcN und den Vergleichsstämmen IMT13962, MG1655 und SF68 auf die Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 wurde im Infektionstest und durch anschließende Bestimmung der koloniebildenden Einheiten adhärenter P2005/03 definiert (3.2.6). Die Ergebnisse wurden in Relation zur Monoinfektion von P2005/03 und in Abhängigkeit von der zeitlichen Applikation der Stämme angegeben (Abb. 11).

Durch Vorinkubation von EcN wurde die Infektionsrate von P2005/03 um 83 % reduziert ($p=0,001$). Im Gegensatz dazu hatte die Koinkubation von EcN keinen Einfluss auf die Infektionsrate ($p=0,912$). Die Nachinkubation erhöhte die Infektionsrate um 70 %. Obwohl dieser Effekt statistisch signifikant war ($p=0,011$), zeigten sich in den Ergebnissen starke Schwankungen, was anhand der hohen Standardabweichung deutlich wird. Tatsächlich hatte die Nachinkubation von EcN manches Mal einen geringfügig stimulierenden Effekt auf die Infektionsrate, ein anderes Mal wurde diese drastisch gesteigert (um bis zu 370 %). Trotz zahlreicher Wiederholungen des Versuches, größtmöglicher Standardisierung der Versuchsbedingungen und Ausschluss technischer Fehler ließ sich die Streuung der Ergebnisse nicht reduzieren.

Der inhibierende Effekt bei Vorinkubation von EcN unterschied sich signifikant vom Effekt der Ko- und Nachinkubation ($p=0,025$ und $p=0,009$). Ebenso zeigte sich ein signifikanter

Unterschied zwischen Ko- und Nachinkubation ($p=0,025$). Die eingesetzten Vergleichsstämme IMT13962, MG1655 und SF68 hatten unabhängig von ihrer zeitlichen Applikation keinen oder kaum Einfluss auf die Infektionsrate von P2005/03. Die Inhibierung der Infektionsrate durch Vorinkubation von EcN sowie die Erhöhung durch Nachinkubation waren somit spezifisch für EcN. Auch hier waren die Unterschiede zu den Vergleichsstämmen signifikant (Vorinkubation: $p_{\text{EcN vs. IMT13962, MG1655, SF68}}=0,009$; Nachinkubation: $p_{\text{EcN vs. IMT13962}}=0,047$; $p_{\text{EcN vs. MG1655}}=0,009$; $p_{\text{EcN vs. SF68}}=0,025$).

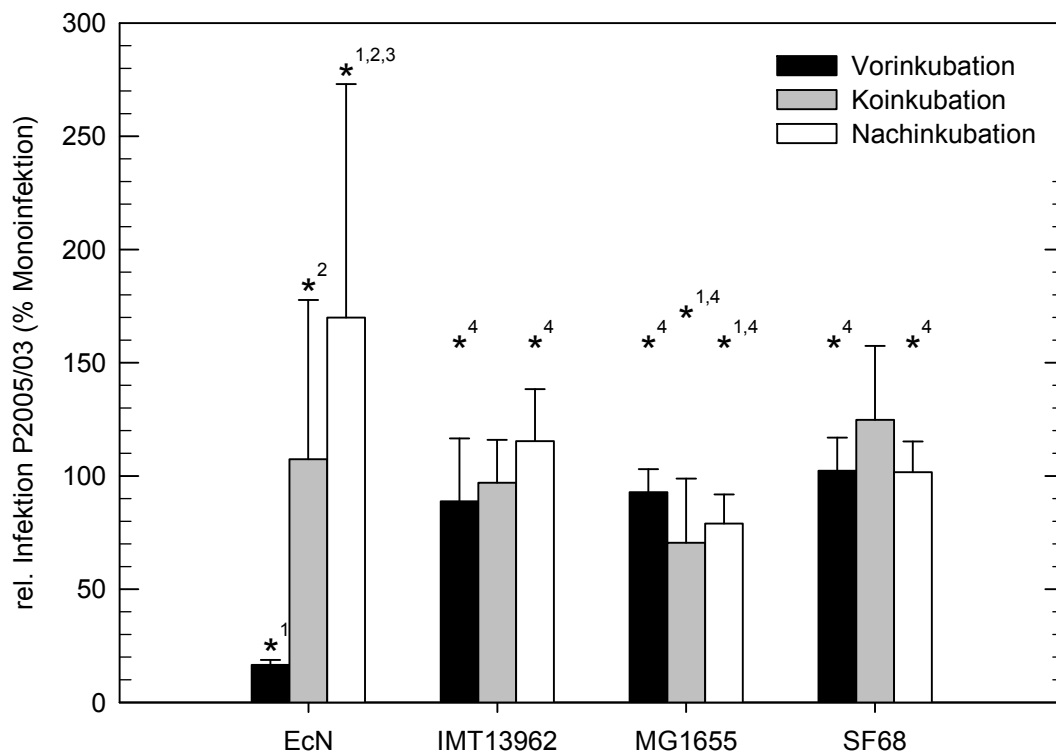


Abb. 11: Infektionsraten von P2005/03 an IPEC-J2 unter Einfluss von EcN

Die Infektion von P2005/03 auf IPEC-J2 erfolgte für 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS (12-Loch-Zellkulturplatten). Die Daten sind angegeben in Relation zur Monoinfektion von P2005/03 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$, ¹ vs. Monoinfektion, ² vs. Vorinkubation innerhalb einer Gruppe, ³ vs. Koinkubation innerhalb einer Gruppe, ⁴ vs. EcN innerhalb einer Kategorie; Gruppen: EcN, IMT13962, MG1655, SF68; Kategorien: Vor-, Ko-, Nachinkubation

4.2.2 Einfluss von EcN auf Adhäsion, Mikrokoloniebildung und Bildung von A/E-Läsionen durch aEPEC

Durch die Bestimmung der Infektionsraten von P2005/03 konnten Unterschiede in der Infektionsstärke unter Einfluss von EcN aufgezeigt werden. Die Ergebnisse ließen jedoch keine Rückschlüsse darauf zu, welche Schritte der Infektion durch EcN beeinflusst wurden. Daher wurden die Infektionstests (3.2.6) auch auf Deckgläsern durchgeführt und diese im Anschluss mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie (3.3.1) oder Rasterelektronenmikroskopie (3.3.2) ausgewertet. Dadurch war es möglich, Effekte von EcN auf die Adhäsion, die Mikrokoloniebildung und die Ausbildung von A/E-Läsionen zu beurteilen. Für die mikroskopische Auswertung war eine Unterscheidung von P2005/03 und EcN auf den Epithelzellen unerlässlich. Da die Stämme unterschiedliche O-Antigene aufweisen (EcN: O6, P2005/03: O108), konnte P2005/03 mit dem gegen das *E. coli*-O-Antigen O108 gerichteten Antikörper Anti-O108 spezifisch immunomarkiert werden (3.3.1.2). Je nachdem, ob die Präparate am Fluoreszenz- oder Rasterelektronenmikroskop ausgewertet wurden, erfolgte im Anschluss die Detektion dieser Primärantikörper mit TRITC-markierten oder goldmarkierten Sekundärantikörpern.

Abb. 12 zeigt konfokale laserscanningmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 ohne Einfluss von EcN (Monoinfektion) sowie bei Vor-, Ko- und Nachinkubation von EcN. P2005/03 wurde wie beschrieben immunomarkiert (rot gefärbt). Die Ausbildung von A/E-Läsionen wurde durch Anfärben des Zytoskelettproteins Aktin mit FITC-Phalloidin im FAS-Test (3.3.1.3) überprüft (grün gefärbt). Im Anschluss erfolgte eine unspezifische DNA-Färbung mit Propidiumiodid zur Visualisierung der Zellkerne und Bakterien (3.3.1.4) (blau gefärbt). Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass P2005/03 ohne Einfluss von EcN lokal begrenzt an IPEC-J2 in sehr kompakten Mikrokolonien adhärierte. Durch Vorinkubation von EcN wurden die Anzahl der Mikrokolonien verringert und deren Wachstum massiv gestört. Adhärenz Bakterien von P2005/03 bildeten nur vereinzelt kleine, lockere Mikrokolonien. Das Wachstum in Mikrokolonien wurde auch bei Ko- und Nachinkubation gestört, doch nahm dieser Effekt deutlich ab, je später EcN appliziert wurde. Im Gegensatz zur Vorinkubation wurde jedoch ein zusätzlicher Effekt beobachtet, die Anzahl adhärenz Bakterien bzw. Mikrokolonien war erhöht. Die Ausbildung von A/E-Läsionen durch P2005/03 wurde bei Vor-, Ko- und Nachinkubation von EcN nicht beeinflusst. In Mikrokolonien anheftende Bakterien waren in allen Varianten immer FAS-positiv. FAS-negativ waren ausschließlich vereinzelt adhärenz Bakterien.

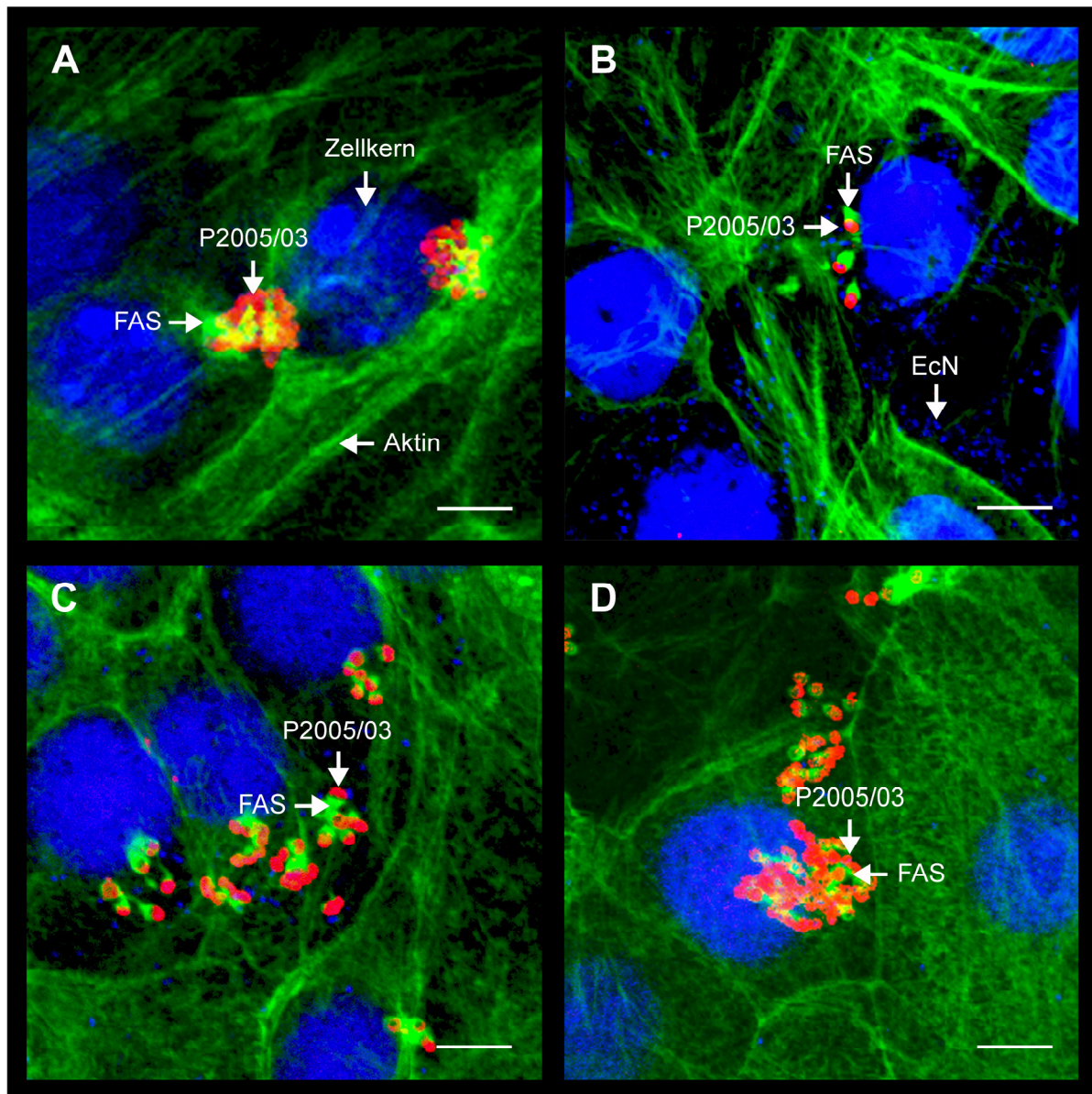


Abb. 12: Konfokale laserscanningmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 unter Einfluss von EcN

Die Infektion von P2005/03 auf IPEC-J2 erfolgte für 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS ohne Einfluss von EcN (Monoinfektion) (A), bei Vorinkubation von EcN (B), bei Koinkubation von EcN (C) und bei Nachinkubation von EcN (D). P2005/03 wurde mit Hilfe der Primärantikörper Anti-O108 und der Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG-TRITC (rot) spezifisch angefärbt. A/E-Läsionen wurden im FAS-Test durch Anfärbung des Aktins nachgewiesen (grün). Zur Visualisierung von Zellkernen und EcN wurde die DNA mit Propidiumiodid angefärbt (blau). Gelbe Bereiche stellen eine Überlagerung rot gefärbter P2005/03 und grün gefärbter Aktinakkumulationen dar. Maßstab 10 µm

Zur Quantifizierung der visuellen Eindrücke am konfokalen Laserscanningmikroskop wurden zusätzlich die Anzahl und die Größe der Mikrokolonien sowie der Anteil FAS-positiver Mikrokolonien am Epifluoreszenzmikroskop bestimmt. Hierzu wurden in zwei unabhängigen Tests

im Doppelansatz je 10 Sichtfelder fotografiert (Vergrößerung 1:400) und im Anschluss in Adobe Photoshop ausgewertet (3.3.1.7). Die Größe der Mikrokolonien wurde durch die Anzahl ihrer Bakterien definiert (1-3: vereinzelt adhärente Bakterien, 4-10: klein, 11-20: mittelgroß, >20: groß).

Die Ergebnisse der Quantifizierung (Tab. 11 und Abb. 13) zeigten, dass P2005/03 ohne Einfluss von EcN (Monoinfektion) v. a. mittelgroße (24 %) und große (54 %), sehr kompakte Mikrokolonien bildete, aber weniger vereinzelt (14 %) oder in kleinen Kolonien (8 %) adhärierte. Bei Vorinkubation von EcN bildete der Stamm nur sehr wenige mittelgroße und große Kolonien, die deutlich aufgelockert waren (3 %, $p=0,001$ bzw. 1 %, $p=0,001$). Der Anteil kleiner Kolonien (24 %, $p=0,003$) und vereinzelt adhärenter Bakterien (72 %, $p=0,001$) nahm stark zu. Insgesamt betrachtet reduzierte sich die Anzahl von vereinzelt adhärenen Bakterien und Mikrokolonien (= Adhäsion) im Vergleich zur Monoinfektion von P2005/03 auf 52 % ($p=0,001$). Dieses Ergebnis verdeutlichte, dass sowohl die Adhäsion als auch das Wachstum der Mikrokolonien von P2005/03 durch Vorinkubation von EcN inhibiert wurden.

Im Gegensatz dazu wurde durch Koinkubation von EcN die Adhäsion von P2005/03 um 58 % erhöht ($p=0,001$). Die Mikrokoloniebildung wurde hingegen ebenfalls gestört, jedoch in geringerem Maße als bei der Vorinkubation von EcN. Die Bakterien adhärierten zu 46 % vereinzelt ($p=0,001$). Es wurden häufig kleine Mikrokolonien gebildet (37 %, $p=0,001$), seltener mittelgroße (11 %, $p=0,001$) und große (6 %, $p=0,001$). Die Mikrokolonien waren weniger kompakt als in der Monoinfektion. Die Nachinkubation von EcN steigerte die Adhäsion von P2005/03 noch deutlicher (um 125 %, $p=0,001$). Die Mikrokoloniebildung wurde weniger gestört als bei Vor- und Koinkubation von EcN. 30 % der Kolonien stellten vereinzelt adhärente Bakterien ($p=0,001$), 27 % kleine ($p=0,001$), 22 % mittelgroße ($p=0,867$) und 21 % große Mikrokolonien ($p=0,001$) dar. Die Mikrokolonien waren auch hier weniger kompakt als in der Monoinfektion. Obwohl in Bezug zur Gesamtzahl der Mikrokolonien der Anteil großer Kolonien gegenüber der Monoinfektion verringert war, zeigte der Vergleich der absoluten Anzahl keinen Unterschied zwischen Monoinfektion und Nachinkubation von EcN ($p=0,285$). Bei der Nachinkubation von EcN wiesen große Mikrokolonien zum Teil aber eine wesentlich höhere Anzahl von Bakterien auf. Da bei sehr großen Mikrokolonien die Anzahl der Bakterien nur noch geschätzt, aber nicht gezählt werden konnte, wurde auf eine weitere Differenzierung verzichtet.

Die Quantifizierung der FAS-positiven Bakterien und Mikrokolonien zeigte, dass in allen Varianten in Mikrokolonien anheftende Bakterien immer FAS-positiv waren. FAS-negativ waren ausschließlich vereinzelt adhärente Bakterien. Dieses wurde jedoch auch bei der Monoinfektion von P2005/03 beobachtet. Relativ zur Anzahl vereinzelt adhärenter Bakterien betrachtet erhöhte sich der Anteil FAS-negativer Bakterien durch EcN nicht.

Tab. 11: Quantifizierung der Mikrokolonien von P2005/03 nach Anzahl und Größe

Anzahl Mikrokolonien pro Sichtfeld		Monoinfektion	Vorinkubation EcN	Koinkubation EcN	Nachinkubation EcN
gesamt	n	16,50	8,96	26,00	37,10
	% Monoinfektion	100	54,3	157,6	224,8
	p		0,001	0,001	0,001
FAS-positiv	n	15,28	6,61	23,53	32,41
	% gesamt	92,6	73,7	90,5	87,4
	p		0,001	0,023	0,029
FAS-negativ *	% Größe 1-3 ¹	54,2	36,3	20,5	42,2
	p		0,415	0,057	0,940
vereinzelt adhärent (1-3) ¹	n	2,25	6,50	12,08	11,10
	p		0,001	0,001	0,001
	% gesamt	13,7	72,5	46,5	29,9
	p		0,001	0,001	0,001
klein (4-10) ¹	n	1,38	2,14	9,53	10,12
	p		0,123	0,001	0,001
	% gesamt	8,3	23,9	36,6	27,3
	p		0,003	0,001	0,001
mittelgroß (11-20) ¹	n	4,00	0,25	2,94	8,15
	p		0,001	0,052	0,001
	% gesamt	24,2	2,8	11,3	22,0
	p		0,001	0,001	0,867
groß (>20) ¹	n	8,88	0,07	1,44	7,73 ²
	p		0,001	0,001	0,285
	% gesamt	53,8	0,8	5,6	20,8
	p		0,001	0,001	0,001

* FAS-negativ waren in allen Varianten ausschließlich vereinzelt adhärente Bakterien

¹ Anzahl Bakterien pro Mikrokolonie

² beinhalten auch wesentlich größere Kolonien

Die Infektion von IPEC-J2 mit P2005/03 erfolgte für 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die spezifische Anfärbung von P2005/03 erfolgte mit Hilfe der Primärantikörper Anti-O108 und der Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG-TRITC. A/E-Läsionen wurden im FAS-Test durch Anfärbung des Aktins nachgewiesen. Zur Visualisierung von Zellkernen und EcN wurde die DNA mit Propidiumiodid angefärbt. Pro Test und Variante wurden im Doppelansatz je 10 Sichtfelder am Epifluoreszenzmikroskop fotografiert (Vergrößerung 1:400) und im Anschluss in Adobe Photoshop ausgewertet. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Tests. p=Signifikanzniveau vs. Monoinfektion

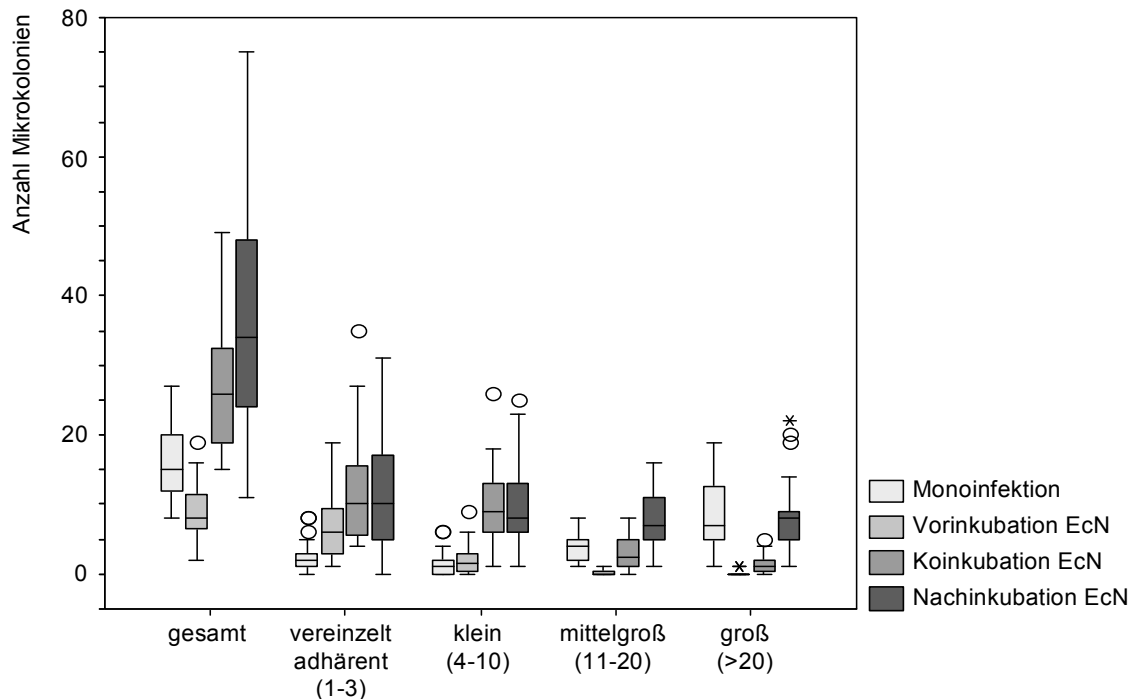


Abb. 13: Boxplotdiagramm zur Darstellung der Wertestreuung bei der Quantifizierung der Mikrokolonien von P2005/03 nach Anzahl und Größe

Die Box umfasst den Wertebereich zwischen dem 1. und 3. Quartil (50 % der Werte). Der Median (50 %-Quantil) wurde als schwarze Linie in der Box dargestellt. Die Whiskersenden stellen Minimum- und Maximumwert ohne Berücksichtigung von Ausreißern und Extremen dar. Als Ausreißer wurden die Werte definiert, deren Abstand vom 1. bzw. 3. Quartil zwischen dem 1,5- und 3-fachen des Interquartilabstandes (Boxhöhe) lag (Kreissymbol). Als Extreme wurden die Werte definiert, deren Abstand vom 1. bzw. 3. Quartil größer als das 3-fache des Interquartilabstandes war (Sternsymbol).

Um einen Eindruck davon zu erhalten, inwieweit sich beispielsweise Oberflächenstrukturen der Bakterien oder der Epithelzellen unter Einfluss von EcN veränderten, wurden in Ergänzung zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (Abb. 14 bis Abb. 18). Dabei zeigte sich, dass die in der Fluoreszenzmikroskopie beobachteten aufgelockerten Mikrokolonien oft sogenannte Mischkolonien von Bakterien von P2005/03 und EcN darstellten. Die von EcN gebildeten filamentartigen Strukturen (siehe auch Abb. 5) umspannten auch zu einem gewissen Grad Bakterien von P2005/03 (Abb. 18 B bis D). P2005/03 selbst bildete hingegen keine filamentartigen Strukturen. Durch die Oberflächendarstellung und hohe Tiefenschärfe der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen war es zudem möglich, den Einfluss von EcN auf die Podestbildung durch P2005/03 zu bewerten. In der Monoinfektion wurden von P2005/03 oftmals sehr flache, kaum erkennbare Podeste ausgebildet. Sehr große und sehr dichte Mikrokolonien zeigten teilweise eine deutliche Podestbildung (Abb. 18 A). Unter Einfluss von EcN, sowohl bei Vor- als auch bei Ko- und Nachinkubation, zeigte sich vielfach eine Elongation der Podeste, unabhängig der Größe der Mikrokolonien (Abb. 18 B bis D).

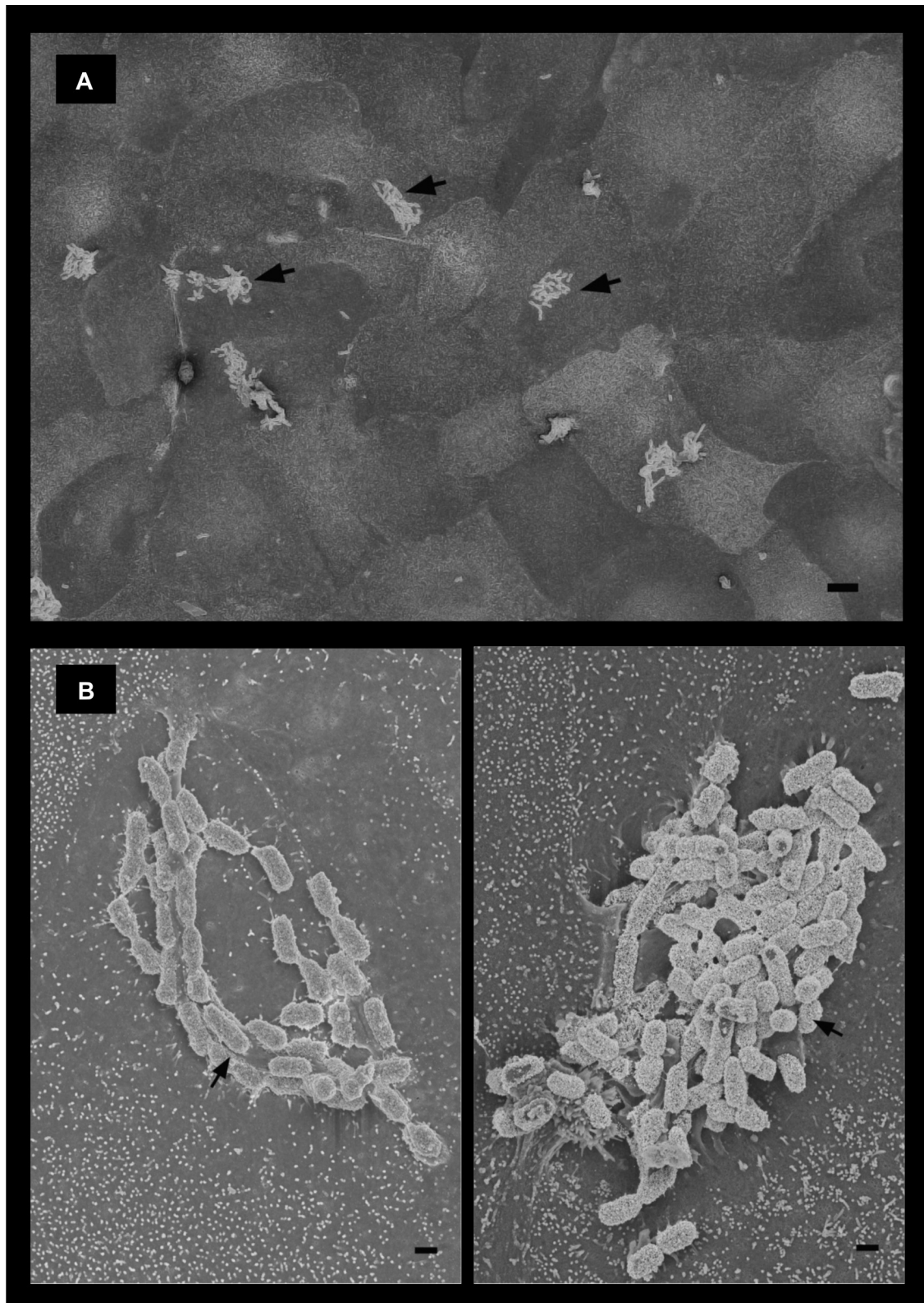


Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 bei Monoinfektion

A: Maßstab 10 μm , B: Maßstab 1 μm ; 6 h Infektion, MOI 100, 37 °C, DMEM/HAM'S-FKS P2005/03 (schwarze Pfeile) wurde zur Unterscheidung von EcN (weiße Pfeile) mittels polyklonaler Antikörper gegen den *E. coli*-Serotyp O108 immunogoldmarkiert.

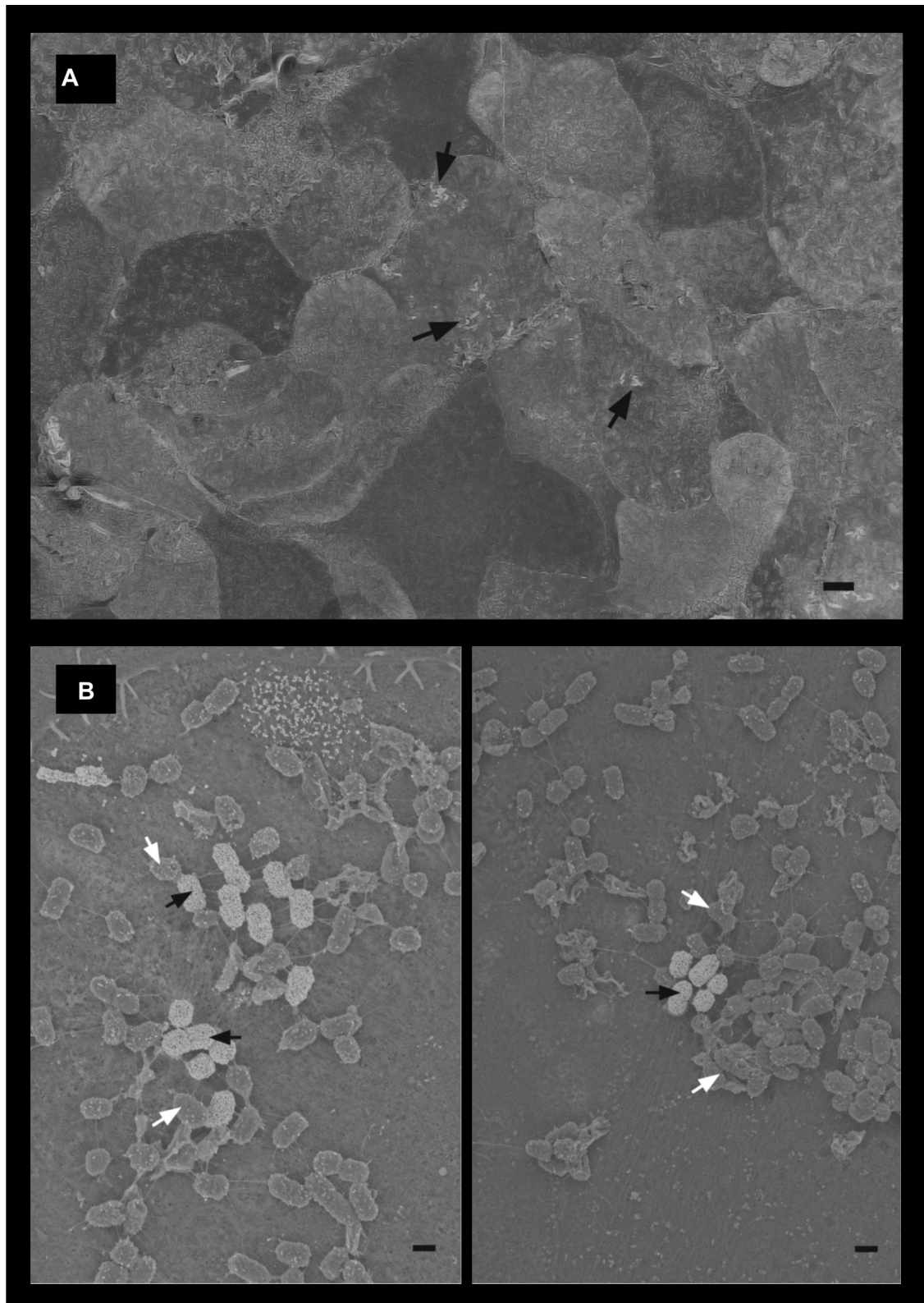


Abb. 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN

A: Maßstab 10 µm, B: Maßstab 1 µm; 6 h Infektion, MOI 100, 37 °C, DMEM/HAM'S-FKS P2005/03 (schwarze Pfeile) wurde zur Unterscheidung von EcN (weiße Pfeile) mittels polyklonaler Antikörper gegen den *E. coli*-Serotyp O108 immunogoldmarkiert.

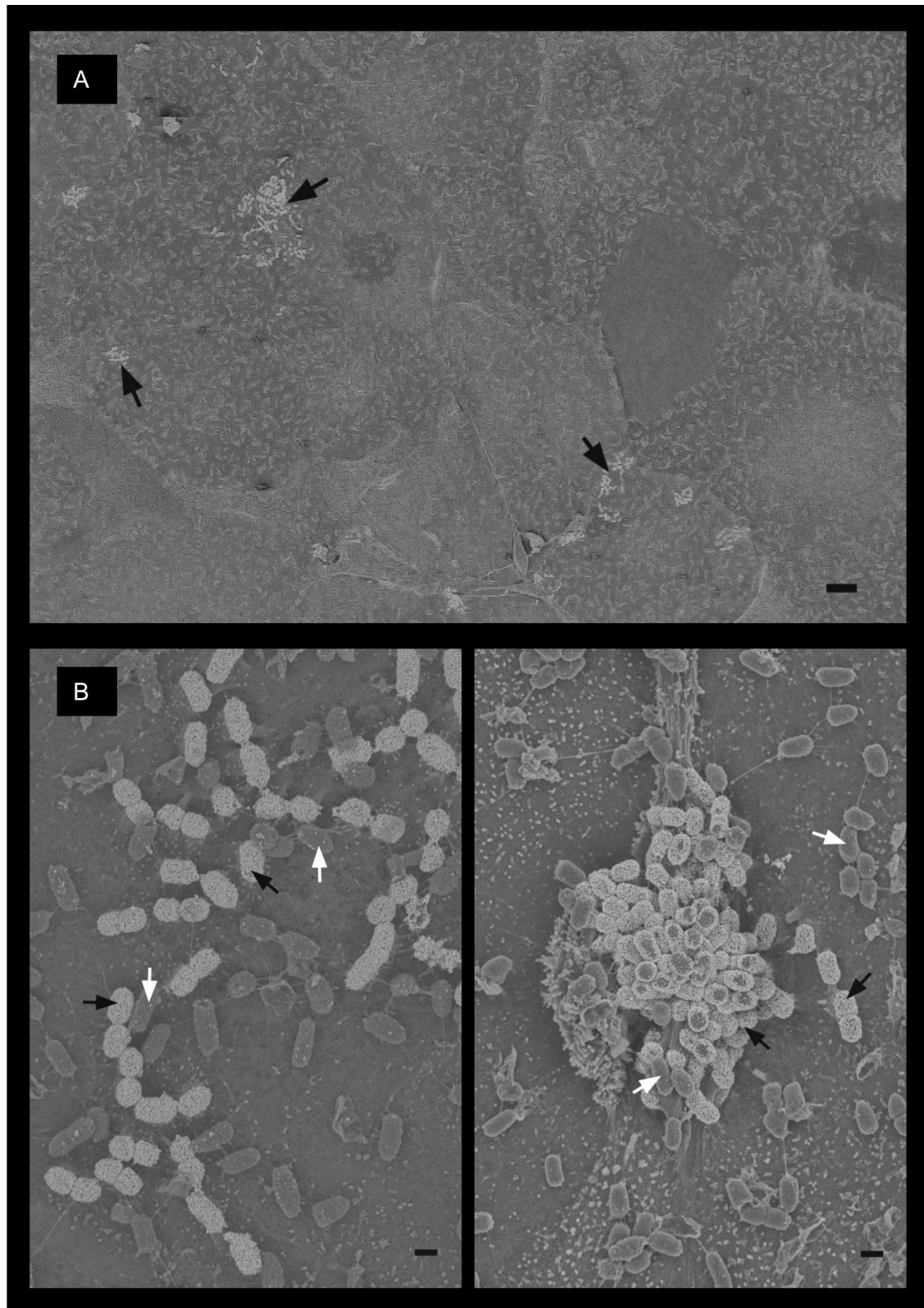


Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 bei Koinkubation von EcN

A: Maßstab 10 μm , B: Maßstab 1 μm ; 6 h Infektion, MOI 100, 37 °C, DMEM/HAM'S-FKS P2005/03 (schwarze Pfeile) wurde zur Unterscheidung von EcN (weiße Pfeile) mittels polyklonaler Antikörper gegen den *E. coli*-Serotyp O108 immunogoldmarkiert.

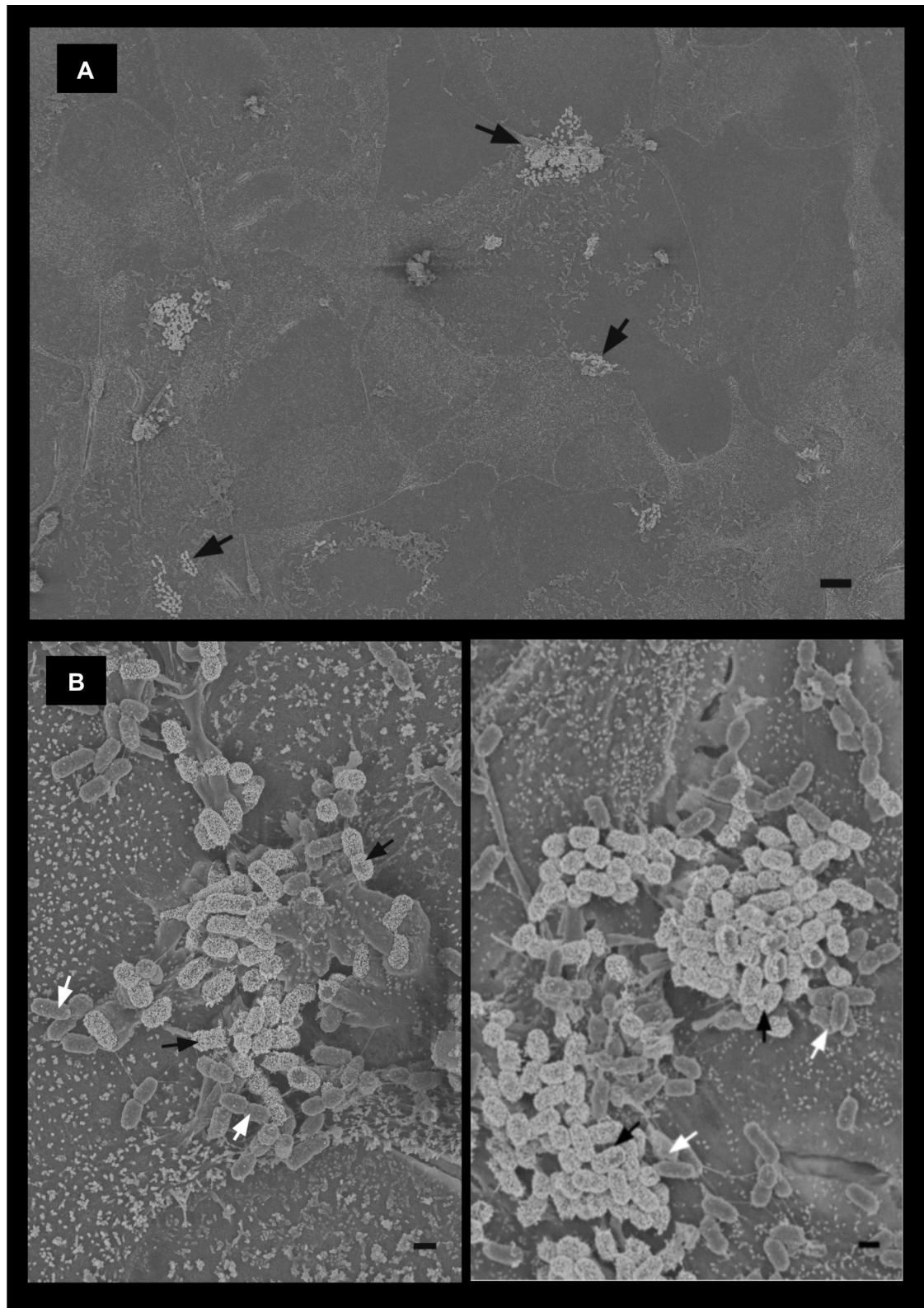


Abb. 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 bei Nachinkubation von EcN

A: Maßstab 10 μm , B: Maßstab 1 μm ; 6 h Infektion, MOI 100, 37 °C, DMEM/HAM'S-FKS P2005/03 (schwarze Pfeile) wurde zur Unterscheidung von EcN (weiße Pfeile) mittels polyklonaler Antikörper gegen den *E. coli*-Serotyp O108 immunogoldmarkiert.

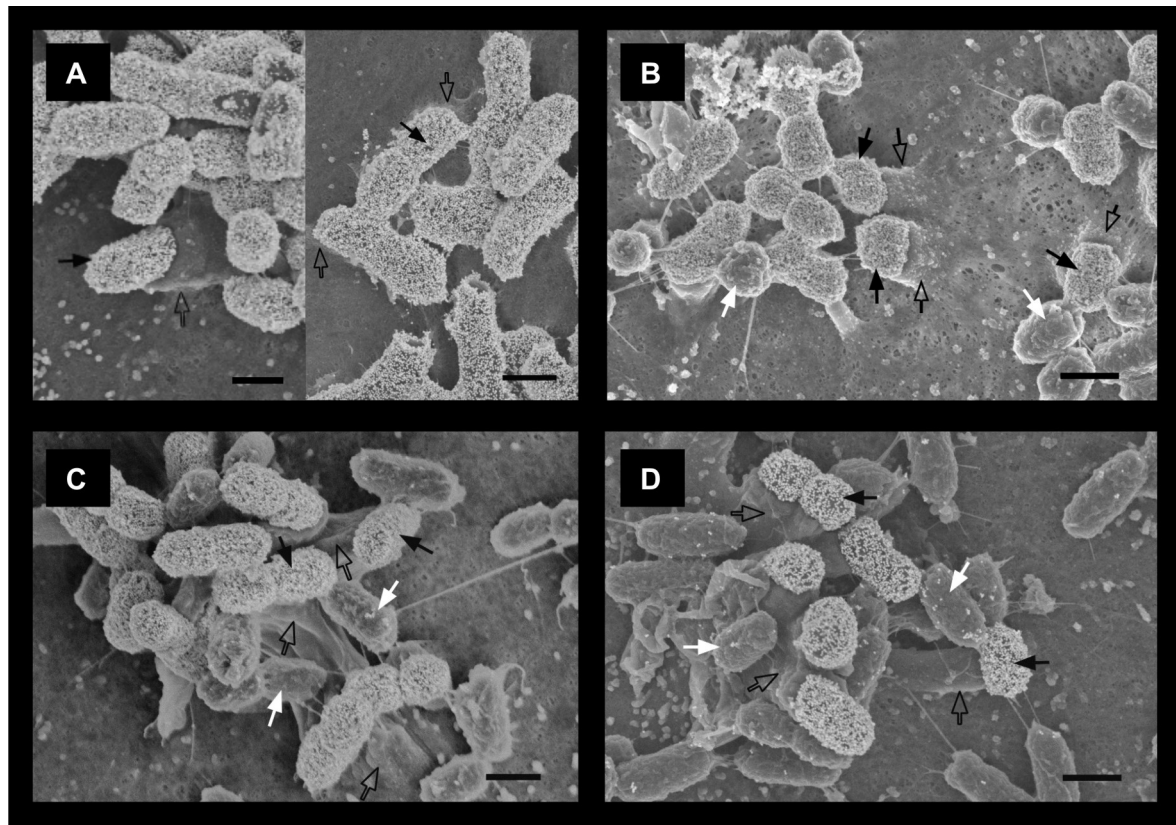


Abb. 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 unter Einfluss von EcN: Podestbildung

A: Monoinfektion, B: Vorinkubation von EcN, C: Koinkubation von EcN, D: Nachinkubation von EcN
 Maßstab 1 μm , 6 h Infektion, MOI 100, 37 °C, DMEM/HAM'S-FKS; P2005/03 (schwarze Pfeile) wurde zur Unterscheidung von EcN (weiße Pfeile) mittels polyklonaler Antikörper gegen den *E. coli*-Serotyp O108 immunogoldmarkiert. Schwarz umrandete Pfeile kennzeichnen Podeste unterhalb von P2005/03.

4.3 Charakterisierung des inhibierenden Effektes von EcN auf die aEPEC-Infektion bei Vorinkubation

Wie bereits dargestellt, reduzierte EcN die Infektion von IPEC-J2 mit P2005/03 nur bei Vorinkubation (4.2). Im Weiteren schlossen sich deshalb v. a. Arbeiten zur Charakterisierung dieses inhibierenden Effektes an. Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die im Folgenden dargestellten Ergebnisse deshalb auf Vorinkubationsexperimente.

4.3.1 Einfluss von EcN auf das Wachstum von aEPEC auf IPEC-J2

4.3.1.1 Einfluss von EcN auf das Wachstum von aEPEC im Zellkulturüberstand

Das verwendete Zellkultursystem stellte eine diskontinuierliche Kultur im geschlossenen System dar (batch-Kultur), der einmalig zu Beginn Nährstoffe zugeführt wurden. Das Wachstum der Bakterien in einer batch-Kultur ist im Allgemeinen zu Beginn durch Adaptation an die Wachstumsbedingungen gekennzeichnet (geringes Wachstum, lag-Phase). Es folgt ein stetiges und gleich bleibendes Wachstum mit geringer Absterberate (log-Phase). Bei zunehmender Bakteriendichte nimmt die Konzentration an Nährstoffen jedoch ab und es häufen sich Stoffwechselprodukte an. Als Folge verlangsamen die Bakterien ihr Wachstum (Übergang zur stationären Phase). Im Infektionstest wurde der Übergang in die stationäre Phase von P2003/05 verhindert, indem nach 3 h Infektion das Zellkulturmedium erneuert wurde. Durch den Wechsel des Zellkulturmediums wurden der Kultur neue Nährstoffe zugefügt und die Anzahl der Bakterien stark verdünnt, da nur an den Epithelzellen adhärente Bakterien in der Kultur verblieben. Bei Vorinkubation von EcN erhöhte sich die Bakteriendichte durch die Adhäsion von EcN an IPEC-J2 zu Infektionsbeginn. Im Infektionsverlauf vermehrte sich EcN auf der Zelloberfläche und im Zellkulturmedium zeitgleich mit P2005/03, was eine höhere Gesamtzahl an Bakterien, einen erhöhten Nährstoffverbrauch und eine höhere Konzentration an Stoffwechselprodukten verursachte. Eine mögliche Folge könnte die Hemmung des Bakterienwachstums durch frühzeitige Nährstofflimitierung oder Belastung durch Stoffwechselprodukte sein. Eine dadurch bedingte verringerte Bakterienanzahl von P2005/03 könnte deshalb mögliche Ursache für eine verringerte Infektionsrate sein.

Deshalb wurde das Wachstum von P2005/03 im Zellkulturüberstand überprüft. Dazu wurden die Zellen mit EcN, IMT13962, MG1655 und SF68 vorinkubiert und im Anschluss im Infektionstest (3.2.6) über einen Zeitraum von 3 h jede Stunde die Bakteriendichte von P2005/03 im Zellkulturüberstand durch Zählung koloniebildender Einheiten auf Agarplatten bestimmt (3.1.2).

Durch die Vorinkubation von EcN wurde das Wachstum von P2005/03 um 20 % bis 26 % reduziert (Abb. 19). Diese Wachstumshemmung wurde bereits nach 1 h beobachtet und setzte sich über den weiteren Infektionsverlauf fort. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich keine statistische Signifikanz, aber ein deutlicher Trend ($p=0,062$; Trend $p\leq 0,1$). Im Gegensatz dazu beeinflussten IMT13962 und SF68 das Wachstum von P2005/03 im Zellkulturüberstand nicht ($p_{\text{vs. IMT13962}}=0,923$; $p_{\text{vs. SF68}}=0,901$). Für MG1655 konnte ein gering stimulierender, aber nicht signifikanter Effekt auf das Wachstum verzeichnet werden (10 %, $p=0,376$).

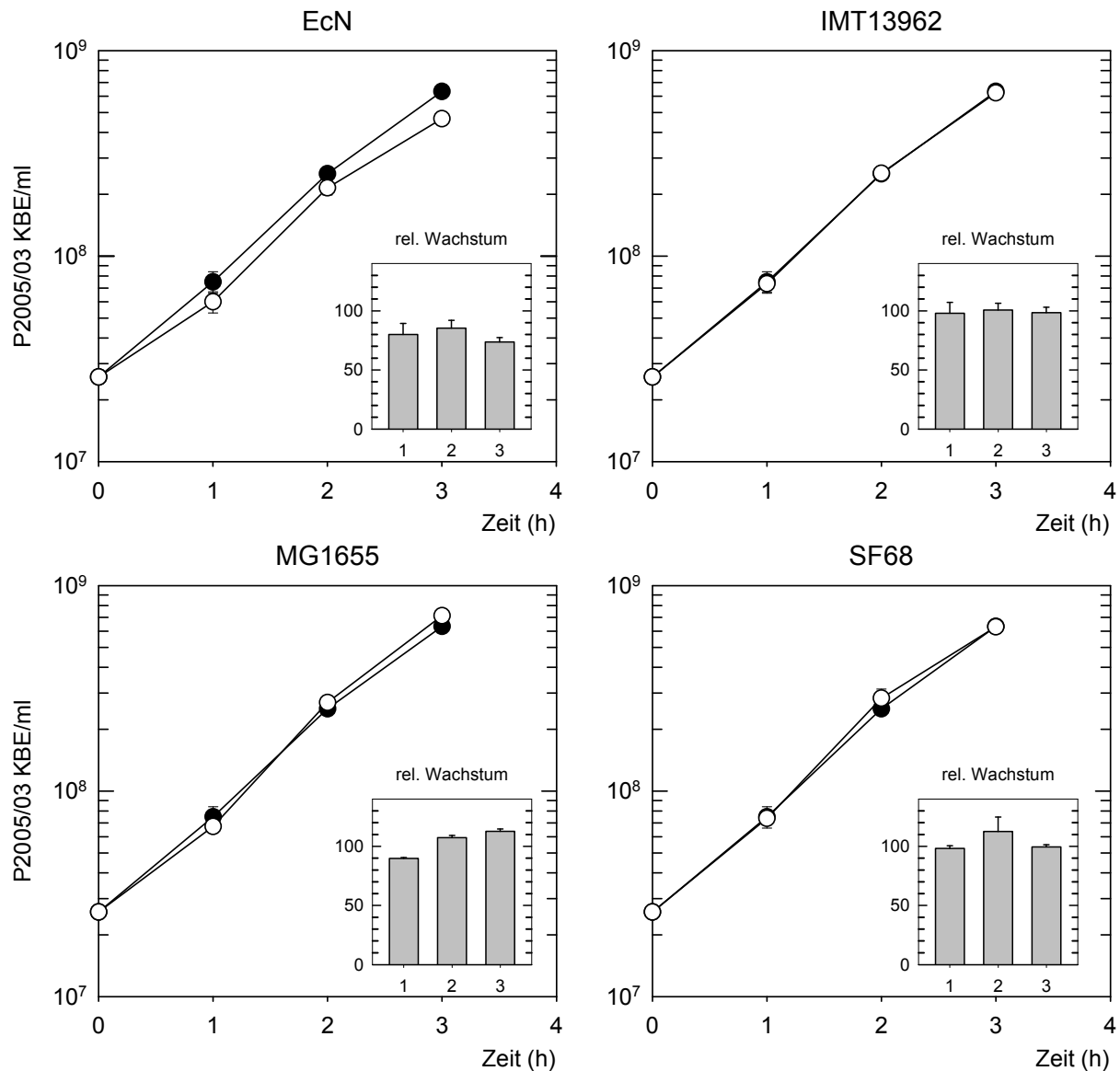


Abb. 19: Wachstumskinetik von P2005/03 im Zellkulturüberstand auf IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN

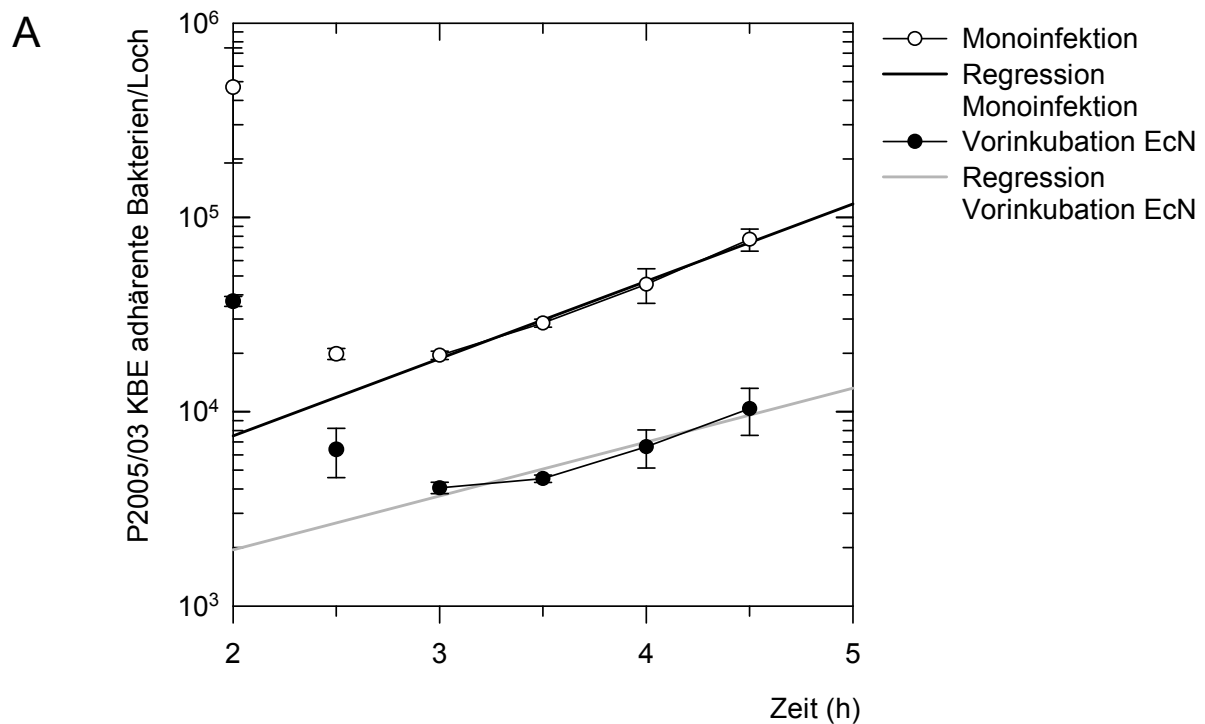
Die Infektion von IPEC-J2 mit P2005/03 erfolgte für 3 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Jede Stunde wurde die Bakterienanzahl von P2005/03 im Zellkulturüberstand bestimmt (KBE=koloniebildende Einheiten). Die Darstellung der Daten erfolgte als Wachstumskurve vergleichend für die Monoinfektion (schwarze Kreise) und die Vorinkubation von EcN und den Vergleichstämmen (weiße Kreise). Zur besseren Veranschaulichung der Effekte auf das Wachstum von P2005/03 wurde im jeweiligen Diagramm ein weiteres kleines Diagramm eingefügt, welches das rel. Wachstum in Relation zur Monoinfektion darstellt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests.

4.3.1.2 Einfluss von EcN auf das Wachstum adhärenter aEPEC

Um die Größenzunahme der Mikrokolonien von P2005/03 genauer zu quantifizieren, wurden Wachstumskinetiken mit adhärenen Bakterien von P2005/03 durchgeführt.

Nach einer Infektionszeit von 2 h in einer batch-Kultur wurden die Bedingungen einer semi-kontinuierlichen Kultur eingestellt. Über einen Zeitraum von 2,5 h wurden dann periodisch alle 30 min (entspricht der Verdopplungszeit von P2005/03 im Zellkulturmedium) das Zellkulturmedium und alle nicht adhärenen Bakterien abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Damit sollte die erneute Adhäsion von Bakterien aus dem Zellkulturmedium verhindert werden, wodurch das Größenwachstum der Mikrokolonien bestimmt werden konnte. Darüber hinaus sollten dem Zellkultursystem neue Nährstoffe zugefügt und Stoffwechselprodukten entfernt werden, um eine Nährstofflimitierung oder Anreicherung von Stoffwechselprodukten als Ursache für eine Wachstumshemmung ausschließen zu können.

Abb. 20 A zeigt, dass bereits 2 h nach Infektionsbeginn (batch-Kultur) die Infektionsrate von P2005/03 bei Vorinkubation von EcN gegenüber der Monoinfektion deutlich verringert war (um 90 %, $p=0,026$). Beim Waschen der Zellen und dem Wechsel des Mediums zum Einstellen der semikontinuierlichen Kulturbedingungen löste sich eine große Anzahl adhärenter aEPEC von IPEC-J2 ab. Dieser Effekt war gleichermaßen bei der Monoinfektion und bei der Vorinkubation von EcN zu verzeichnen und trat zu späteren Zeitpunkten, bei denen nur das Medium gewechselt wurde, nicht auf. Als Ursache für das Ablösen der Bakterien ist demzufolge mit großer Wahrscheinlichkeit das Waschen der Zellen anzusehen. Der Effekt trat sowohl beim Waschen mit 1xPBS als auch mit DMEM/HAM'S-FKS auf. Zur Berechnung der Wachstumsparameter von P2005/03 wurde deshalb nur der Zeitraum herangezogen, in dem die Anzahl der Bakterien zunahm (3 h bis 4,5 h). Anhand der errechneten Regressionen wurde deutlich, dass bei Vorinkubation von EcN adhärenente P2005/03 langsamer wuchsen ($p=0,056$). Die Verdopplungszeit erhöhte sich dabei auf das 1,5-fache. Dies resultierte in einem um 32 % verringerten Wachstum (Abb. 20 B).



B

	Monoinfektion	Vorinkubation EcN
Regression	$y = 0,398 x - 3,08$	$y = 0,277 x - 2,73$
Verdopplungszeit t_d	45 min 26 s	66 min 26 s
Teilungsrate v	$1,32 \text{ h}^{-1}$	$0,9 \text{ h}^{-1}$
Wachstumsrate μ	$0,92 \text{ h}^{-1}$	$0,63 \text{ h}^{-1}$
		$\Delta v: - 31,8 \%$
		$\Delta \mu: - 31,5 \%$

Abb. 20: Wachstumskinetik adhärenter P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN

Die Infektion von IPEC-J2 mit P2005/03 erfolgte mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S für zunächst 2 h. Danach wurden alle nicht adhärenten Bakterien durch dreimaliges Waschen entfernt und frisches Medium hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte alle 30 min ein Auswechseln des Mediums ohne Waschen der Zellen. Die Mittelwerte der Infektionsraten (KBE: koloniebildende Einheiten) \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests wurden in A graphisch dargestellt. B zeigt die berechneten Regressionen und Wachstumsgrößen für den Zeitraum von 3 h bis 4,5 h.

4.3.1.3 Einfluss der Bildung von Mikrozininen durch EcN auf das Wachstum von aEPEC

Es ist bekannt, dass EcN die Mikrozine H47 und M produziert (Patzner et al., 2003). Mikrozine sind niedermolekulare Peptide, die von Enterobakterien gebildet werden und antibakteriell gegen phylogenetisch verwandte Stämme wirken können (Duquesne et al., 2007). Um zu überprüfen, inwieweit diese Mikrozine eine antagonistische Wirkung auf P2005/03 haben, wurde die Bildung der Mikrozine durch EcN und die Empfindlichkeit von P2005/03 gegenüber diesen Mikrozininen im Plattenhemmtest (3.1.6) bestimmt. Zur Kontrolle der Mikrozinbildung durch EcN wurde der mikrozinempfindliche *E. coli*-Stamm H5316 eingesetzt. Die Bildung bzw. Empfindlichkeit gegenüber Mikrozin war an der Ausbildung eines Hemmhofes erkennbar.

Für EcN konnte die Bildung von Mikrozininen bestätigt werden. Der mikrozinempfindliche Stamm H5316 wurde durch EcN in seinem Wachstum in LB-Topagar gehemmt. IMT13962 und MG1655 bildeten hingegen keine Mikrozine (Abb. 21 A). P2005/03 wurde durch die Mikrozinbildung von EcN nicht in seinem Wachstum beeinträchtigt (Abb. 21 B).

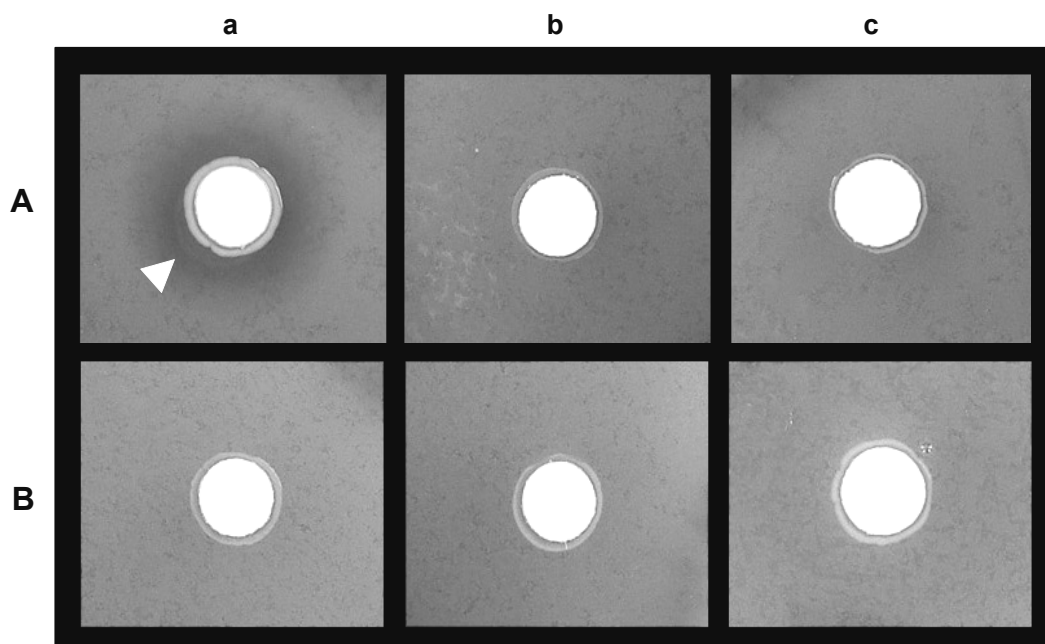


Abb. 21: Test auf Mikrozinempfindlichkeit von P2005/03

Der mikrozinempfindliche Stamm H5316 (A) und P2005/03 (B) wurden in LB-Topagar auf LB-Agarplatten aufgebracht. EcN (a), IMT13962 (b) und MG1655 (c) wurden auf Filterpapierplättchen, die auf den Topagar aufgelegt wurden, aufgetropft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bildung bzw. Empfindlichkeit gegenüber Mikrozin ist an der Ausbildung eines Hemmhofes erkennbar (weißer Pfeil). Nur EcN produzierte Mikrozin. P2005/03 reagierte dem gegenüber unempfindlich (kein Hemmhof).

4.3.2 Bedeutung der Fimbrien von EcN für den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion

4.3.2.1 Bedeutung der Fimbrien für die Adhäsion von EcN an IPEC-J2

Die Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen wird durch verschiedene bakterielle Adhäsionsfaktoren vermittelt (Adhäsine). Wichtige Adhäsine stellen dabei die Fimbrien dar (Ofek und Doyle, 1994). EcN besitzt Typ 1- (*fim*-Operon), F1C- (*foc*-Operon) und Curli-Fimbrien (Blum et al., 1995; Grozdanov et al., 2004). Es wurde untersucht, durch welche Fimbrien die sehr gute Adhäsionsfähigkeit von EcN an IPEC-J2 vermittelt wurde. Die Arbeitsgruppe T. A. Ölschläger (Universität Würzburg) stellte für diese Arbeiten Einzelmutanten für Typ 1-Fimbrien (EcN Δfim) und F1C-Fimbrien (EcN Δfoc) sowie eine Doppelmutante (EcN $\Delta focfim$) zur Verfügung. Diese Mutanten wurden im Adhäsionstest (3.2.5) auf IPEC-J2 eingesetzt und deren Adhäsionsrate mit der des EcN-Wildtyps verglichen.

Die Deletion des *foc*-Operons in EcN führte zum fast vollständigen Verlust der Adhäsionsfähigkeit an IPEC-J2 (Abb. 22). Gegenüber dem EcN-Wildtyp war die Adhäsionsrate von EcN Δfoc und EcN $\Delta focfim$ um 99,9 % bzw. 99,8 % reduziert ($p=0,001$). EcN Δfim wies demgegenüber keine Veränderung in der Adhäsion auf. Darüber hinaus erwies sich die Adhäsion von EcN an IPEC-J2 als nicht sensitiv gegenüber α -D-Mannose (Ergebnisse nicht abgebildet). Eine Bindung über Typ 1-Fimbrien würde durch α -D-Mannose jedoch gehemmt werden (Ofek und Doyle, 1994). Es konnte damit gezeigt werden, dass die Adhäsion von EcN an IPEC-J2 durch F1C-Fimbrien vermittelt wird. Typ 1-Fimbrien spielen hingegen für die Adhäsion keine Rolle.

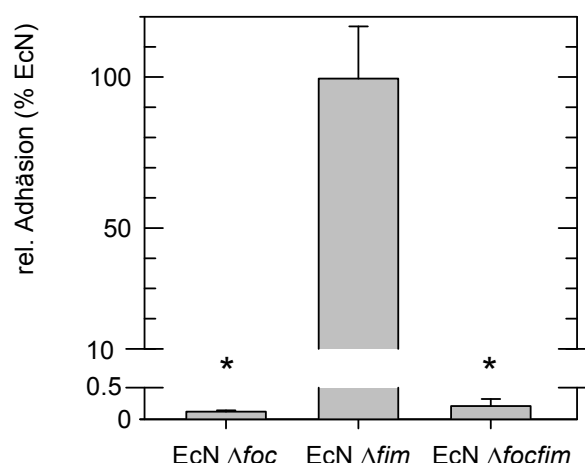


Abb. 22: Vergleich Adhäsion EcN Δfoc , EcN Δfim und EcN $\Delta focfim$ an IPEC-J2 nach 2 h

Die Inkubation der Stämme erfolgte für 2 h auf IPEC-J2 mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Daten sind angegeben in Relation zur Adhäsion von EcN als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$ vs. EcN

4.3.2.2 Bedeutung der durch F1C-Fimbrien vermittelten Adhäsion von EcN für den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion

Im Infektionstest (3.2.6) wurde mit Hilfe der Vorinkubation von EcN Δfoc , EcN Δfim und EcN $\Delta focfim$ überprüft, ob die Adhäsion von EcN via F1C-Fimbrien den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion vermittelte. Im Vergleich zum EcN-Wildtyp zeigten EcN Δfoc und EcN $\Delta focfim$ keinen oder einen geringfügig inhibierenden Effekt auf die Infektionsrate (Abb. 23). EcN Δfim reduzierte demgegenüber die Infektion wie EcN drastisch um 90 % ($p=0,001$). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die Adhäsion von EcN via F1C-Fimbrien den inhibierenden Effekt vermittelte.

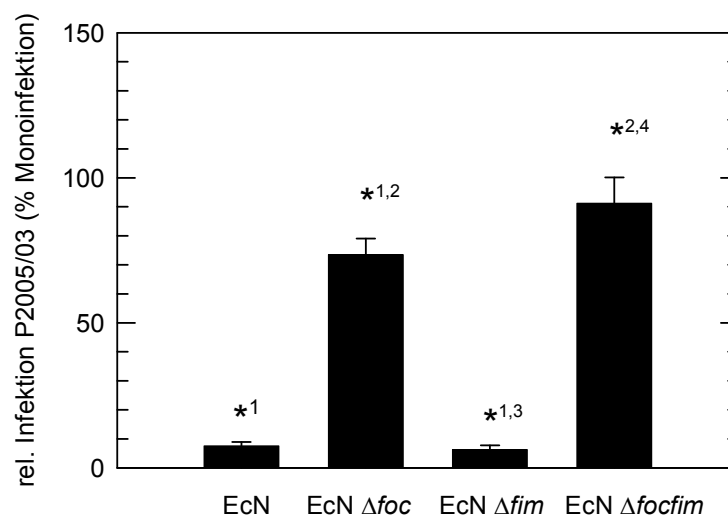


Abb. 23: Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN Δfoc , EcN Δfim und EcN $\Delta focfim$

Die Infektion von P2005/03 auf IPEC-J2 erfolgte für 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Daten sind angegeben in Relation zur Monoinfektion von P2005/03 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$, ¹ vs. Monoinfektion, ² vs. EcN, ³ vs. EcN Δfoc , ⁴ vs. EcN Δfim

4.3.2.3 Komplementierung eines F1C-negativen *E. coli*-Stammes mit dem *foc*-Operon

Um endgültig zu beweisen, dass der Verlust der sehr guten Adhäsionsfähigkeit und des inhibierenden Effektes auf die aEPEC-Infektion tatsächlich auf die Deletion der F1C-Fimbrien in EcN zurückzuführen war, sollte EcN Δ *foc* mit dem *foc*-Operon komplementiert werden. Darüber hinaus sollte das *foc*-Operon in IMT13962 und MG1655 eingebracht werden. Beide Stämme wiesen im Wildtyp keine F1C-Fimbrien auf und waren deutlich weniger adhärent an IPEC-J2 als EcN. Anhand dessen sollte untersucht werden, ob durch Bildung von F1C-Fimbrien die Stämme besser an IPEC-J2 adhärieren und dadurch ebenfalls ein inhibierender Effekt auf die aEPEC-Infektion vermittelt wird. Von der Arbeitsgruppe T. A. Ölschläger (Universität Würzburg) wurde dafür der Cosmid-Klon pCosF1C6 aus einer mit Hilfe des SuperCos1-Vektors (Stratagene, Heidelberg) erstellten EcN-Genombank zur Verfügung gestellt. Das Cosmid pCosF1C6 enthielt das vollständige *foc*-Operon. Es wurde mittels Elektroporation (3.4.6.2) in EcN Δ *foc*, MG1655 und IMT13962 eingebracht.

Die Transformation von EcN Δ *foc* gelang nicht. Erfolgreich transformierte Klone von MG1655 verloren das Cosmid trotz Antibiotikaselektion nach zwei- bis dreimaligem Überimpfen. Zudem zeigten die Klone ein extrem langsames Wachstum.

EcN besitzt bereits 2 kleine, genetisch sehr stabile Plasmide mit einem ColE1- bzw. ColE2-ähnlichen Replikationsursprung (Blum-Oehler et al., 2003). Um eine mögliche Plasmidinkompatibilität mit dem SuperCos1-Vektor (ColE1-Replikationsursprung) zu umgehen, wurde versucht, das *foc*-Operon (ca. 12,5 kb) in den Cosmidvektor pLA2917 [RK2-Replikationsursprung, (Allen und Hanson, 1985)] zu klonieren. Die Transformation von EcN Δ *foc* mit pLA2917 gelang ebenfalls nicht. Somit konnte EcN Δ *foc* nicht mit dem *foc*-Operon komplementiert werden. Der endgültige Nachweis, ob der Verlust der Adhäsionsfähigkeit von EcN Δ *foc* und des inhibierenden Effektes auf die aEPEC-Infektion auf die Deletion der F1C-Fimbrien zurückzuführen war, konnte damit nicht erbracht werden. Es gelang jedoch, IMT13962 über Einbringen des Cosmids pCosF1C6 mit dem *foc*-Operon zu komplementieren (IMT13962 pCosF1C6). Das Cosmid blieb über mindestens 8 Generationen stabil im Stamm erhalten. Der Nachweis erfolgte mittels Plasmidaufarbeitung (3.4.1.2) und PCR (*focA*) (3.4.4). Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme in Abb. 24 zeigt die Adhäsion der Komplementante an IPEC-J2 nach 4 h Inkubation. Ein Teil der Bakterien produzierte in solch starkem Maße Fimbrien, dass die Oberfläche der Bakterien vollständig von ihnen bedeckt wurde. Die Überproduktion deutet auf eine nicht kontrollierte, übermäßige Expression der *foc*-Gene und eine außerordentliche metabolische Belastung der Bakterienzelle hin.

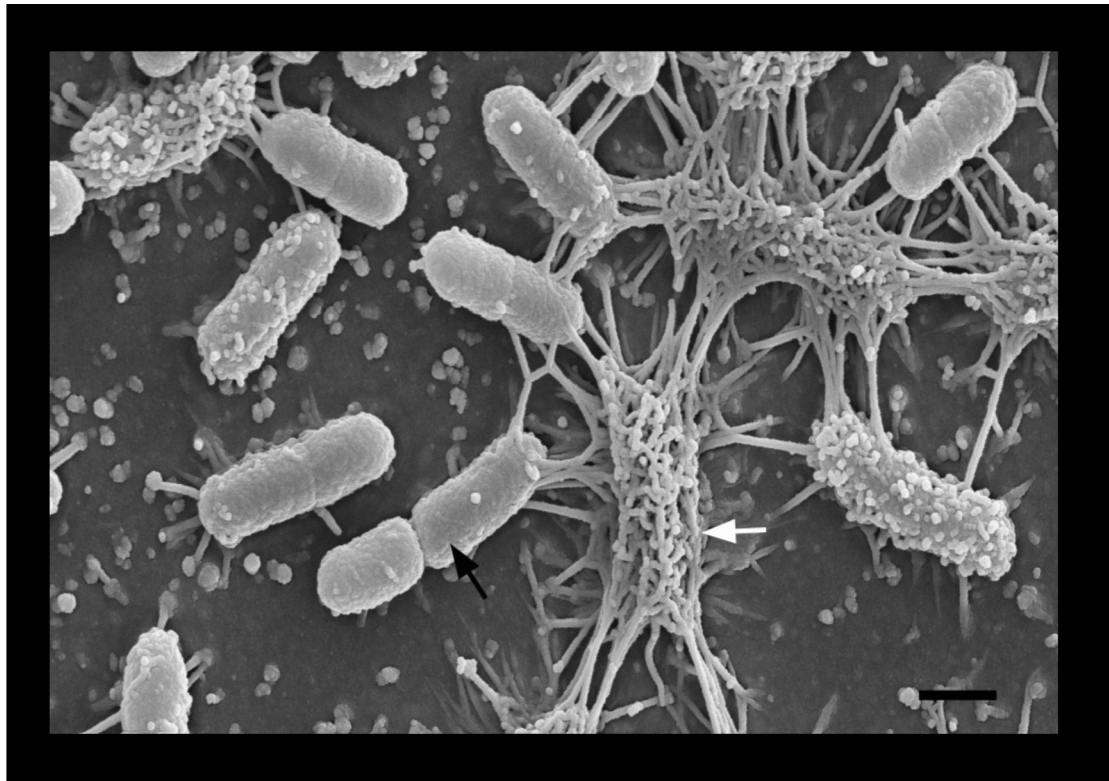


Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von IMT13962 pCosF1C6 an IPEC-J2 nach 4 h

Die Inkubation auf IPEC-J2 erfolgte mit MOI 100 für 4 h bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Der schwarze Pfeil kennzeichnet die Bakterien, der weiße Pfeil die Fimbrien. Maßstab 1 μm

Im Adhäsionstest wurde überprüft, ob IMT13962 pCosF1C6 gegenüber dem Wildtyp IMT13962 eine höhere Adhäsionsfähigkeit an IPEC-J2 besitzt. Dabei zeigte sich, dass die Adhäsionsrate von IMT13962 pCosF1C6 um 200 % anstieg ($p=0,023$), jedoch 50 % unter der von EcN lag ($p=0,008$; Abb. 25). Die Ergebnisse bestätigten, dass F1C-Fimbrien die sehr gute Adhäsion von *E. coli* an IPEC-J2 vermitteln können. Zusätzlich wurde der Referenzstamm RZ525 auf seine Adhäsionsfähigkeit an IPEC-J2 getestet. Es handelt sich hierbei um einen uropathogenen *E. coli*-Stamm (UPEC), der eine hohe klonale Ähnlichkeit zu EcN aufweist (Grozdanov et al., 2004) und ebenfalls F1C-Fimbrien bilden kann. Die tatsächliche Bildung wurde jedoch nicht überprüft. Auch dieser Stamm adhärierte sehr gut an IPEC-J2, deutlich geringer als EcN (um 45 %, $p=0,036$), aber ähnlich stark wie IMT13962 pCosF1C6 ($p=0,469$).

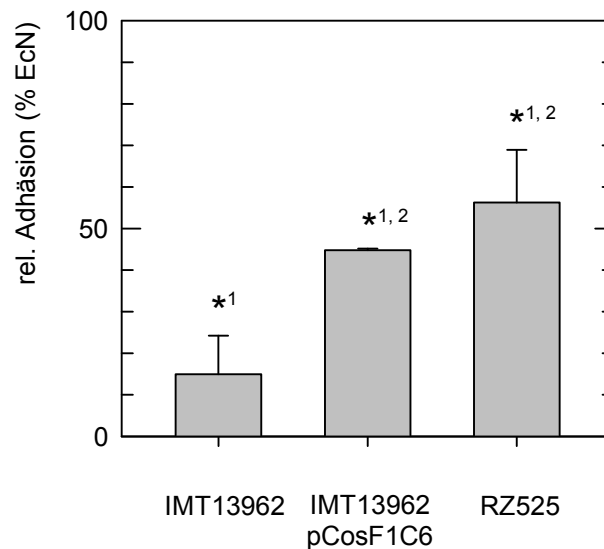


Abb. 25: Vergleich Adhäsion von IMT13962 pCosF1C6 und RZ525 mit EcN und IMT13962-Wildtyp an IPEC-J2 nach 2h

Die Inkubation der Stämme erfolgte für 2 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Daten sind angegeben in Relation zur Adhäsion von EcN als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$, ¹ vs. EcN, ² vs. IMT13962

Um zu überprüfen, ob durch die sehr gute Adhäsion von weiteren *E. coli*-Stämmen über F1C-Fimbrien ein inhibierender Effekt auf die aEPEC-Infektion erzielt werden kann, wurden IMT13962 pCosF1C6 und RZ525 vergleichend zu EcN im Infektionstest mit P2005/03 eingesetzt. Wie in Abb. 26 dargestellt, reduzierte IMT13962 pCosF1C6 die Infektionsrate signifikant um 67 % ($p < 0,041$) und unterschied sich hierin deutlich vom Wildtyp IMT13962 ($p = 0,043$), der die Infektionsrate nur unwesentlich beeinflusste ($p = 0,419$). Der inhibierende Effekt war jedoch geringer als bei Vorinkubation von EcN (67 % vs. 83 %, $p = 0,002$). Der UPEC-Stamm RZ525 zeigte eine deutliche, aber geringere Inhibierung als die Stämme IMT13962 pCosF1C6 und EcN (48 %, $p = 0,175$). Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den in Abb. 25 dargestellten Adhäsionsraten verdeutlicht, dass die Stärke des inhibierenden Effektes von EcN und IMT13962 pCosF1C6 korreliert war mit ihrer Adhäsionsfähigkeit an IPEC-J2. Die verringerte Adhäsion von IMT13962 pCosF1C6 gegenüber EcN resultierte dabei in einer verringerten Inhibierung der aEPEC-Infektion. Gleichzeitig zeigte aber RZ525 im Vergleich zu IMT13962 pCosF1C6 trotz leicht erhöhter Adhäsionsrate einen geringeren inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion. Die Unterschiede zwischen IMT13962 pCosF1C6 und RZ525 waren jedoch nicht signifikant.

Die Ergebnisse zeigen, dass der inhibierende Effekt auf die aEPEC-Infektion durch Einbringen des *foc*-Operons in den nicht adhären Stamm IMT13962 auf diesen übertragen werden konnte. Dadurch wurde belegt, dass die Adhäsion via F1C-Fimbrien den

inhibierenden Effekt vermittelte. Gleichzeitig wurde für einen weiteren an IPEC-J2 sehr gut adhärenen *E. coli*-Stamm (RZ525) ein inhibierender Effekt auf die aEPEC-Infektion nachgewiesen.

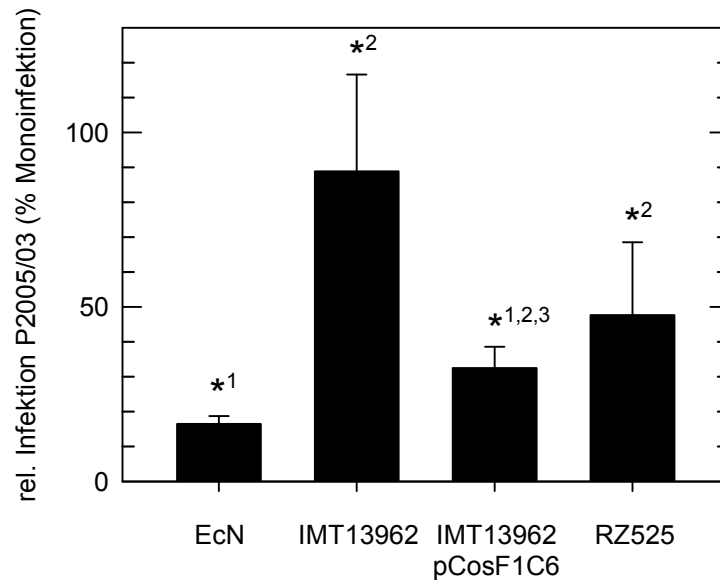


Abb. 26: Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von IMT13962 pCosF1C6 und RZ525

Die Infektion von IPEC-J2 mit P2005/03 erfolgte über 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Daten sind angegeben in Relation zur Monoinfektion von P2005/03 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$, ¹ vs. Monoinfektion, ² vs. EcN, ³ vs. IMT13962

4.3.3 Bedeutung der Flagellen von EcN für den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion

4.3.3.1 Bedeutung der Flagellen für die Adhäsion von EcN an IPEC-J2

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen in Abb. 5 (4.1.1) zeigten, dass EcN auf IPEC-J2 ein Netzwerk aus filamentartigen Strukturen ausbildete, mit dem sich die einzelnen Bakterien untereinander vernetzten. Diese Strukturen unterschieden sich aufgrund ihrer Länge eindeutig von Fimbrien. Da EcN motil ist und Flagellen des Types H1 besitzt (Blum et al., 1995), wurde durch immunhistochemisches Anfärben der Filamente mit polyklonalen Antikörpern gegen H1 überprüft, ob es sich hierbei um Flagellen handelte. EcN wurde dazu mit MOI 100 über verschiedene Zeiträume (20 min bis 4 h) auf IPEC-J2 inkubiert, um Hinweise darauf zu erhalten, ob die Filamente während der Adhäsion gebildet wurden.

Die in Abb. 27 dargestellten epifluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die von EcN gebildeten Filamente durch Antikörper gegen H1 angefärbt wurden und somit Flagellen darstellten. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit und damit von der Adhäsionsstärke von EcN konnte ein Anstieg der Flagellenzahl bzw. eine Verdichtung des Flagellennetzwerkes nachgewiesen werden. Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass die Bakterien nach 20 min deutlich kürzere Flagellen ausbildeten als nach 1 h oder später.

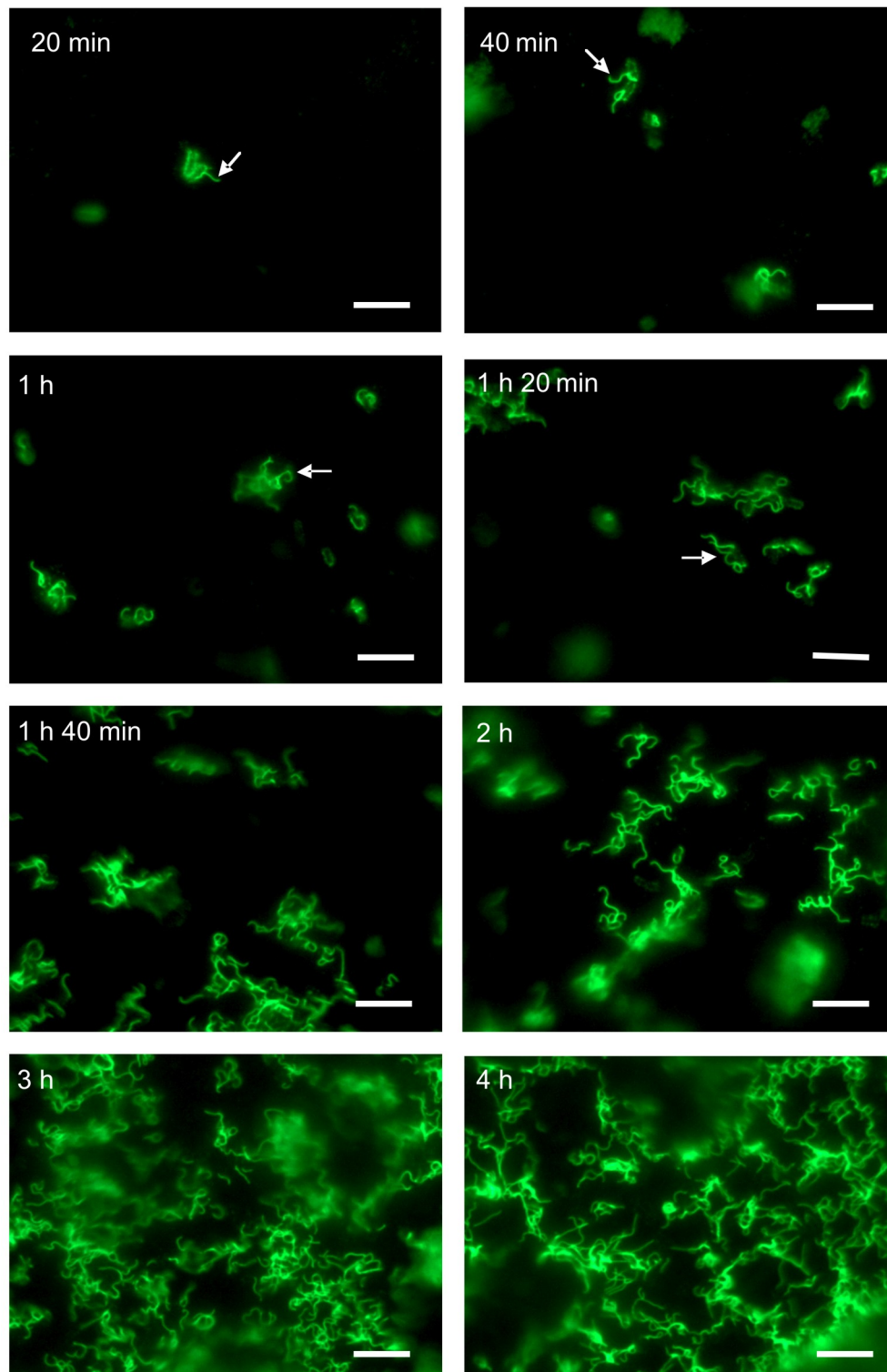


Abb. 27: Bildung von H1-Flagellen durch EcN auf IPEC-J2

EcN wurde über verschiedene Zeiträume auf IPEC-J2 mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss fixiert und die H1-Flagellen mit Hilfe der Primärantikörper Anti-H1 und Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG-FITC angefärbt (grün). Die Auswertung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop. Die Pfeile weisen auf eine Längenzunahme der Flagellen im Zeitraum von 20 min bis 1 h 20 min hin. Maßstab 10 µm

Zur Bestätigung der in Abb. 27 dargestellten Ergebnisse wurde mit Hilfe der Mutagenese nach Datsenko und Wanner (3.4.7) eine *fliA*-Mutante von EcN hergestellt (EcN $\Delta fliA$). *FliA*, ein Klasse 2-Gen des Flagellenoperons, kodiert für den Sigmafaktor 28, welcher die Transkription der hierarchisch nachgegliederten Klasse 3-Gene des Operons reguliert, unter ihnen *fliC* (kodiert für Flagellin) (Liu und Matsumura, 1995; Ohnishi et al., 1990). Die Deletion von *fliA* in EcN sollte damit zum vollständigen Verlust der Flagellenbildung führen.

Die Abb. 28 zeigt eine epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme von EcN $\Delta fliA$ nach 2 h Inkubation auf IPEC-J2 und immunhistochemischer Anfärbung mit Antikörpern gegen H1-Flagellen. Es konnten keine filamentartigen Strukturen mehr nachgewiesen werden. Die zu erkennende Färbung der Bakterienoberfläche war auf eine unspezifische Markierung anderer Oberflächenantigene durch die polyklonalen Primärantikörper zurückzuführen. Sie wurde auch beim EcN Wildtyp nach 20 min Inkubation beobachtet, nach der die Bakterien nur wenige und kurze Flagellen aufwiesen (vergleiche Abb. 27).

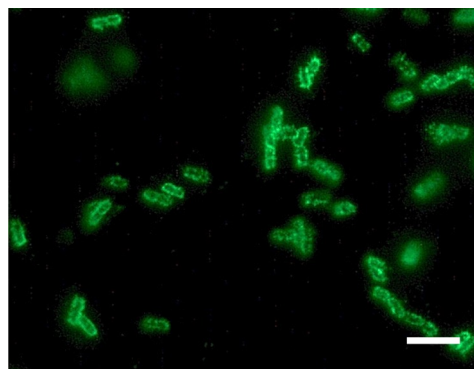


Abb. 28: EcN $\Delta fliA$ auf IPEC-J2 ohne Bildung von H1-Flagellen

EcN $\Delta fliA$ wurde für 2 h auf IPEC-J2 mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss fixiert und mit Hilfe der Primärantikörper Anti-H1 und der Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG-FITC angefärbt (grün). Die Auswertung erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop. Es wurden unspezifische Oberflächenstrukturen der Bakterien jedoch keine Flagellen angefärbt. Maßstab 10 µm

Neben der Fluoreszenzmikroskopie wurde auch die Rasterelektronenmikroskopie genutzt, um die Bildung von Filamenten durch EcN $\Delta fliA$ nach Inkubation auf IPEC-J2 zu überprüfen. Auch hier fehlten diese Strukturen (Abb. 29). Es wurde demnach eindeutig belegt, dass es sich bei den durch EcN auf IPEC-J2 gebildeten filamentartigen Strukturen um Flagellen handelte.

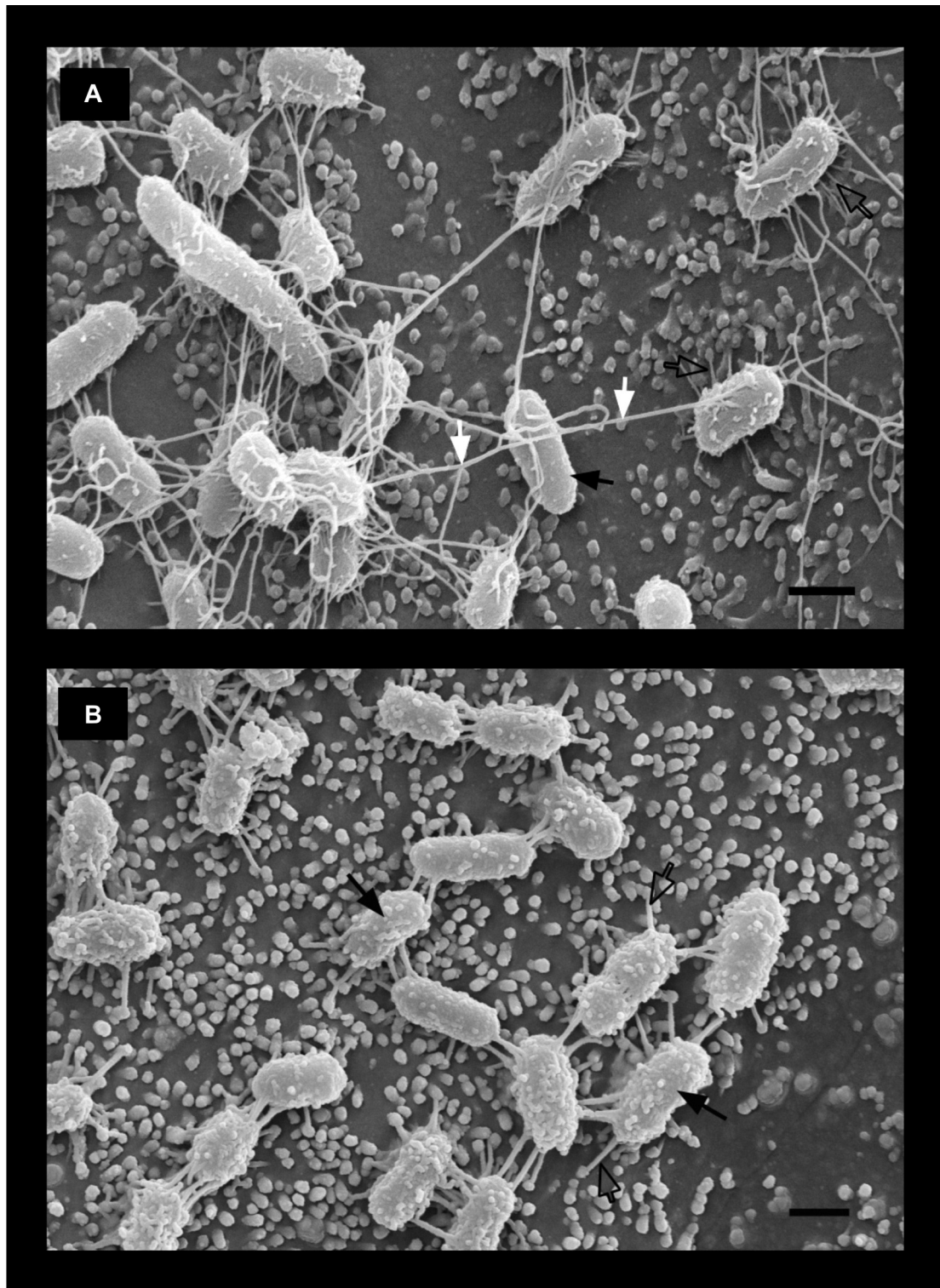


Abb. 29: REM – Bildung eines Flagellen-Netzwerkes durch EcN auf IPEC-J2

Die Stämme wurden für 4 h auf IPEC-J2 mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS inkubiert. Die Zellen wurden fixiert und im Anschluss im Rasterelektronenmikroskop ausgewertet. Der Ausschnitt A zeigt die Flagellenbildung von EcN. Ausschnitt B zeigt die flagellennegative *fliA*-Mutante von EcN. Schwarze Pfeile kennzeichnen die Bakterien, weiße Pfeile Flagellen, schwarz umrandete Pfeile Fimbrien. Maßstab 1 µm

Wie in Abb. 29 A zu erkennen, stellten die durch EcN auf IPEC-J2 gebildeten Flagellen in erster Linie interbakterielle Verbindungen dar. Es wurde daher untersucht, inwieweit die Flagellen auch zur Adhäsion von EcN an IPEC-J2 beitrugen. Dazu wurden EcN und EcN $\Delta fliA$ für 2 h auf IPEC-J2 inkubiert und deren Adhäsion verglichen (3.2.5). Aus Abb. 30 ist ersichtlich, dass die Adhäsionsrate von EcN $\Delta fliA$ im Vergleich zu EcN um 50 % reduziert war ($p=0,001$). Die Bildung von H1-Flagellen auf IPEC-J2 trug demnach wesentlich zur sehr guten Adhäsion von EcN an den Epithelzellen bei.

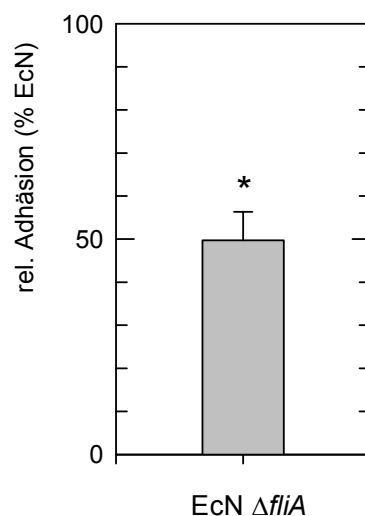


Abb. 30: Adhäsion EcN $\Delta fliA$ an IPEC-J2 nach 2 h

Die Inkubation des Stammes auf IPEC-J2 erfolgte für 2 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Daten sind angegeben in Relation zur Adhäsion von EcN als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$ vs. EcN

4.3.3.2 Einfluss der Flagellenbildung von EcN auf die aEPEC-Infektion

Es wurde überprüft, ob der inhibierende Effekt auf die aEPEC-Infektion bei Vorinkubation von EcN auf die Bildung von H1-Flagellen zurückzuführen war. Dazu wurden der EcN-Wildtyp und EcN $\Delta fliA$ auf IPEC-J2 vorinkubiert und im Infektionstest (3.2.6) der Einfluss auf die Infektionsrate von P2005/03 bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass EcN $\Delta fliA$ die Infektionsrate signifikant um 63 % reduzierte ($p=0,001$) (Abb. 31). Der inhibierende Effekt war jedoch geringer als bei Vorinkubation von EcN (um 92 %; $p_{\text{vs. Monoinfektion}}=0,001$; $p_{\text{vs. EcN } \Delta fliA}=0,001$). Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den in Abb. 30 dargestellten Adhäsionsraten verdeutlicht wie schon zuvor bei den Stämmen IMT13962 pCosF1C6 und RZ525 (4.3.2.3), dass die Stärke des inhibierenden Effektes von EcN und EcN $\Delta fliA$ mit deren Adhäsionsfähigkeit an IPEC-J2 korrelierte.

Die Ergebnisse zeigten, dass EcN auch ohne Ausbildung von H1-Flagellen einen inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion hatte. Mit Hilfe der EcN-Mutanten für Typ 1- und F1C-Fimbrien wurde zuvor nachgewiesen, dass der inhibierende Effekt zwingend von der Adhäsion via F1C-Fimbrien sowie der Adhäsionsstärke abhing (4.3.2.2). Da die Flagellenbildung maßgeblich die Adhäsion von EcN an IPEC-J2 erhöhte, trug sie somit indirekt zum inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion bei.

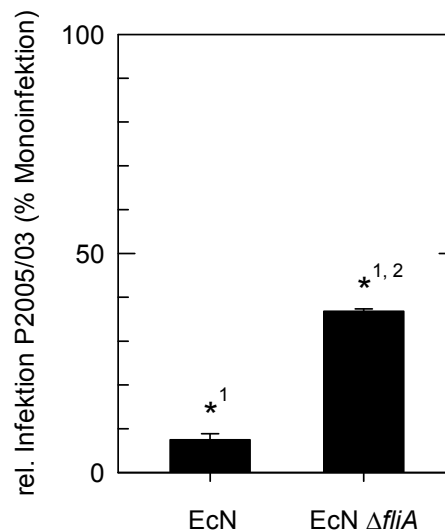


Abb. 31: Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN $\Delta fliA$

Die Infektion von IPEC-J2 mit P2005/03 erfolgte über 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Daten sind angegeben in Relation zur Monoinfektion von P2005/03 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$, ¹ vs. Monoinfektion, ² vs. EcN

4.3.4 Einfluss des Kulturüberstandes von EcN auf die aEPEC-Infektion

Es wurde bisher gezeigt, dass die Adhäsion von EcN grundlegende Voraussetzung für den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion bei Vorinkubation von EcN war. Unklar war jedoch, ob die Adhäsion tatsächlich selbst Ursache für den inhibierenden Effekt war oder aber den eigentlich verantwortlichen Mechanismus vermittelte. Da die Möglichkeit bestand, dass EcN einen inhibierenden Faktor in den Kulturüberstand abgab, wurde dieser hinsichtlich seiner Wirkung auf die aEPEC-Infektion untersucht. Dazu wurden Kulturüberstände (SN) von EcN, IMT13962, MG1655 und SF68 aus Schüttelkulturen in DMEM/HAM'S-FKS bei 37 °C und OD₆₀₀ 1,0 gewonnen (3.1.4) und im Infektionstest vor- oder koinkubiert (3.2.6). Bei Vorinkubation wurde vor dem Beginn der aEPEC-Infektion der Kulturüberstand entfernt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt, so dass der Kulturüberstand nicht direkt auf P2005/03 wirken konnte. Die Kulturüberstände von EcN und

IMT13962 wiesen gegenüber DMEM/HAM'S-FKS einen leicht verringerten pH-Wert auf (DMEM/HAM'S-FKS ca. pH 7,7; SN EcN pH 7,1-7,3; SN IMT13962 pH 7,1-7,3; SN MG1655 pH 7,6-7,7; SN SF68 pH 7,5-7,6).

Es stellte sich heraus, dass die Vorinkubation der Kulturüberstände aller eingesetzten Stämme keinen Einfluss auf die Infektionsrate von P2005/03 nahm (Abb. 32). Im Gegensatz dazu führte aber die Koinkubation der Kulturüberstände von EcN, IMT13962 und MG1655 zu einer deutlichen und signifikanten Verringerung der Infektionsrate um 75 % bis 85 % ($p_{\text{SN EcN}}=0,008$, $p_{\text{SN IMT13962}}=0,010$, $p_{\text{SN MG1655}}=0,003$). Damit übte die Koinkubation der Kulturüberstände einen annähernd gleichen Effekt aus wie die Vorinkubation von EcN (83 % bis 92 %) (4.2.1, 4.3.2). Durch den Kulturüberstand von SF68 wurde die Infektionsrate um 40 % inhibiert ($p=0,071$). Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu den eingesetzten *E. coli*-Stämmen. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass sowohl durch EcN als auch durch IMT13962, MG1655 sowie in geringerem Maß auch durch SF68 ein auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkender Faktor in den Kulturüberstand abgegeben wurde, der nur bei gleichzeitiger Applikation zur aEPEC-Infektion wirkte.

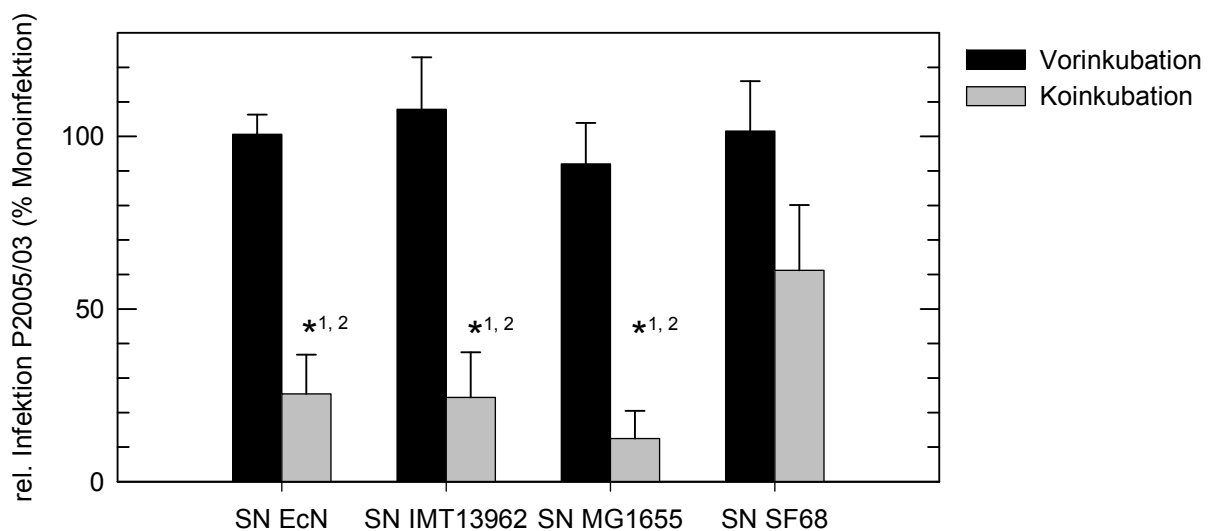


Abb. 32: Einfluss von Kulturüberständen auf die Infektionsraten von P2005/03 an IPEC-J2

Die Kulturüberstände (SN) wurden aus Schüttelkulturen in DMEM/HAM'S-FKS bei 37 °C bei OD₆₀₀ 1,0 gewonnen und auf IPEC-J2 vor- oder koinkubiert. Die Infektion von IPEC-J2 durch P2005/03 erfolgte für 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Daten sind angegeben in Relation zur Monoinfektion von P2005/03 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests.

* $p \leq 0,05$; ¹ vs. Monoinfektion, ² vs. SN SF68

Um zu überprüfen, ob die verringerten Infektionsraten von P2005/03 auf ein verringertes Wachstum des Stammes im Kulturüberstand zurückzuführen waren, wurde im Infektionstest nach 3 h die Bakteriendichte im Zellkulturüberstand durch Zählung der koloniebildenden

Einheiten (KBE) auf Agarplatten bestimmt. Es zeigte sich, dass in den Kulturüberständen von EcN, IMT13962 und MG1655 das Wachstum signifikant um 30 % bis 35 % reduziert war ($p_{\text{EcN}}=0,012$, $p_{\text{IMT13962}}=0,018$, $p_{\text{MG1655}}=0,012$). Im Kulturüberstand von SF68, der die aEPEC-Infektion deutlich weniger inhibierte als die Kulturüberstände der *E. coli*-Stämme, zeigte sich eine geringe, nicht signifikante Inhibierung um 12 % ($p=0,299$).

4.3.5 Untersuchungen zur möglichen Ausscheidung eines inhibierend wirkenden Faktors durch EcN mit Hilfe einer *aroA*-Mutante

Um die Bildung und Ausscheidung eines die aEPEC-Infektion inhibierenden Faktors durch EcN zu verifizieren, sollte dessen mögliche Abgabe in den Kulturüberstand unterbunden werden. Eine Möglichkeit konnte dabei sein, das Wachstum von EcN zu hemmen. Da die Zugabe von wachstumshemmenden Substanzen sowohl EcN als auch P2005/03 beeinflusst und eine Bestimmung des Effektes auf die aEPEC-Infektion unmöglich gemacht hätte, sollte EcN genetisch verändert werden. Durch Vorinkubation eines solchen Stammes auf IPEC-J2 sollte eine definierte Bakterienanzahl zu Infektionsbeginn adhärieren, aber während der Infektion nicht mehr wachsen. Um die Adhäsion an IPEC-J2 zu gewährleisten, war es wichtig, das Wachstum unter kontrollierten Bedingungen ein- und ausschalten zu können. Diesem theoretischen Ansatz folgend, wurde von EcN eine *aroA*-Mutante mit Hilfe der Methode nach Datsenko & Wanner (3.4.7) hergestellt. Das *aroA*-Gen kodiert für das Enzym 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSP) und katalysiert den Shikimisäureweg. Durch Inaktivierung dieses Gens wird unter anderem der Syntheseweg für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tryptophan (Trp) und Tyrosin (Tyr) sowie für para-Aminobenzoesäure und 2,3-Dihydroxybenzoesäure, welche Vorstufen des Vitamins Folsäure bzw. des eisenbindenden Siderophors Enterochelin sind, blockiert (Pittard, 1987). Da aromatische Aminosäuren essentielle Bausteine für die Proteinsynthese darstellen, sind Stämme, denen dieses Gen fehlt, ohne externe Zufuhr aromatischer Aminosäuren nicht mehr wachstumsfähig. Stämme mit intaktem *aroA*-Gen können hingegen aromatische Aminosäuren selbst bilden und sind auch im Mangelmedium vermehrungsfähig. Daher sollte es möglich sein, bei Fehlen von aromatischen Aminosäuren im Zellkulturmedium ab Infektionsbeginn das Wachstum von EcN ΔaroA selektiv zu stoppen und somit die mögliche Ausscheidung eines inhibierenden Faktors zu unterdrücken.

EcN ΔaroA wurde zunächst qualitativ auf die Wachstumsfähigkeit bei Vorhandensein sowie Fehlen aromatischer Aminosäuren auf Nähragar und im Medium überprüft (Tab. 12). Der Stamm wuchs auf LB-Agar, nicht jedoch auf aminosäurefreiem Glukose-Minimalagar. Im Zellkulturmedium (AS-Medium) war der Stamm nicht wachstumsfähig, wenn mindestens eine der aromatischen Aminosäuren Phe, Trp und Tyr fehlte. Dieser Phänotyp war durch Zugabe

aller 3 aromatischen Aminosäuren komplementierbar. Damit zeigte sich, dass das *aroA*-Gen in EcN erfolgreich deletiert wurde und EcN durch die genetische Veränderung entsprechend selektiv in seinem Wachstum gehemmt werden konnte.

Tab. 12: Wachstum von EcN Δ *aroA* auf Nähragar und in Medien mit und ohne aromatische Aminosäuren

	LB Agar	Glukose-Mini-malagar	DMEM/HAM'S	AS-Mangel-medium	AS-Medium	ohne Ala	ohne Arg	ohne Asn	ohne Asp	ohne Cys	ohne Gly	ohne His	ohne Ile	ohne Leu	ohne Lys	ohne Met	ohne Phe	ohne Pro	ohne Ser	ohne Thr	ohne Trp	ohne Tyr	ohne Val
EcN	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EcN Δ <i>aroA</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+

Dargestellt ist das Wachstum von EcN Δ *aroA* im Vergleich zu EcN über Nacht bei 37 °C. Der Mangel von aromatischen Aminosäuren in Glukose-Minimalagar, AS-Mangelmedium sowie AS-Medium ohne Phe, Trp oder Tyr verhinderten ein Wachstum von EcN Δ *aroA*. + Wachstum, - kein Wachstum

Im Anschluss wurde das Wachstum von EcN und EcN Δ *aroA* in An- oder Abwesenheit von IPEC-J2 sowohl im aroAS-Mangelmedium (Phe⁻, Trp⁻, Tyr⁻) als auch in DMEM/HAM'S-FKS (Phe⁺, Trp⁺, Tyr⁺) überprüft. Die Inkubation erfolgte für 2 h in 24-Loch-Zellkulturplatten. Stündlich wurde die Bakterienzahl im Medium bzw. Kulturüberstand durch Ausplattieren auf LB-Agar bestimmt. EcN Δ *aroA* war im aroAS-Mangelmedium ohne IPEC-J2-Zellen nicht vermehrungsfähig, wies aber in Gegenwart der aromatischen Aminosäuren (DMEM/HAM'S-FKS) die gleiche Wachstumsrate wie EcN auf (Abb. 33). Das Ergebnis bestätigt noch einmal die korrekte Deletion des *aroA*-Gens.

Entgegen der Erwartung verlor EcN Δ *aroA* jedoch bei Inkubation in aroAS-Mangelmedium auf IPEC-J2 seinen Phänotyp und war vermehrungsfähig. Im Vergleich zu EcN war das Wachstum aber um 80 % reduziert. Am Mikroskop wurde beobachtet, dass sich schon nach einem relativ kurzen Zeitraum von 1 bis 2 h geplatze Zellen bzw. Zellreste von IPEC-J2 im Medium befanden. Es ist anzunehmen, dass aromatische Aminosäuren aus den abgestorbenen Epithelzellen freigesetzt wurden, die das Wachstum von EcN Δ *aroA* ermöglichten. Die Bedingung eines Mangelmediums für aromatische Aminosäuren konnte demnach in der Zellkultur nicht hergestellt werden. Dadurch war es nicht möglich, das Wachstum von EcN Δ *aroA* selektiv zu hemmen, um die mögliche Bildung und Ausscheidung eines inhibierenden Faktors zu unterdrücken.

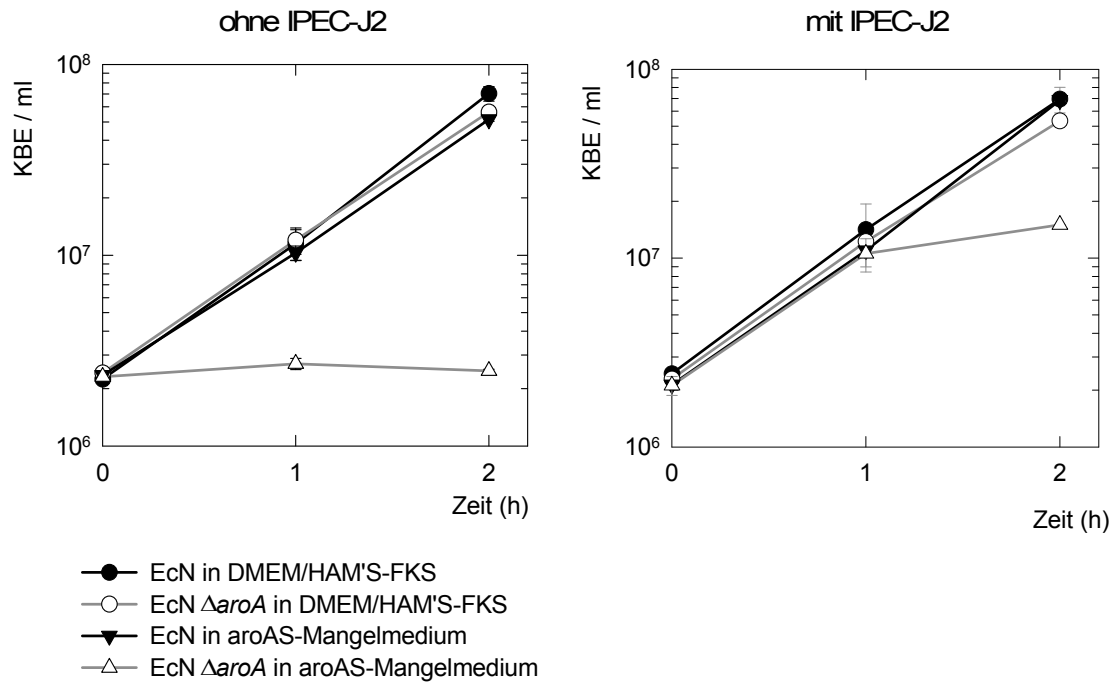


Abb. 33: Wachstum von *EcN* und *EcN ΔaroA* in Abhängigkeit von der Zugabe aromatischer Aminosäuren und IPEC-J2-Zellen

EcN und *EcN ΔaroA* wurden für 2 h in aroAS-Mangelmedium oder DMEM/HAM'S-FKS mit MOI 10 bei 37 °C mit und ohne IPEC-J2 in 24-Loch-Zellkulturplatten inkubiert ($1,3 \times 10^5$ IPEC-J2-Zellen/Loch). Die Daten sind angegeben als log koloniebildende Einheiten (KBE)/ml \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests.

4.3.6 Einfluss der Adhäsionsstärke von *EcN* auf die aEPEC-Infektion

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigten eine Abhängigkeit des inhibierenden Effektes von *EcN* bei Vorinkubation von dessen Adhäsionsfähigkeit auf IPEC-J2 (4.3.2, 4.3.3). Deshalb sollte untersucht werden, wie hoch die Anzahl adhärenter *EcN* sein muss, um einen inhibierenden Effekt zu erzielen. Zur Feststellung dieses Schwellenwertes wurde *EcN ΔaroA* verwendet. Die Mutante wies gegenüber dem Wildtyp ein verringertes Wachstum im verwendeten aroAS-Mangelmedium auf. Die Bakterienzahl auf IPEC-J2 konnte so besser kontrolliert und die einzusetzende MOI genauer abgeschätzt werden.

EcN ΔaroA wurde auf IPEC-J2 mit unterschiedlicher MOI (1, 10, 50, 100, 500 und 1000) vorinkubiert und im Anschluss der Einfluss auf die Infektionsrate von P2005/03 bestimmt. Da aber auch bei *EcN ΔaroA* von der MOI nicht auf die tatsächliche Zahl adhärenter Bakterien geschlossen werden konnte, wurde letztere zu Infektionsende bestimmt. Die Adhäsionsstärke von *EcN ΔaroA* wurde direkt in Beziehung zur Infektionsrate von P2005/03 gesetzt.

Die in Abb. 34 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich der inhibierende Effekt auf die Infektionsrate von P2005/03 mit steigender Adhäsionsrate von *EcN ΔaroA* erhöhte. Es bestand keine lineare Abhängigkeit. Vielmehr trat mit steigender Adhäsionsrate von *EcN ΔaroA* eine Abflachung des Effektes auf. Es wurde eine Adhäsionsstärke von ca. 6×10^6 Bakterien auf $1,3 \times 10^5$ IPEC-J2-Zellen ermittelt, bis zu der kein inhibierender Effekt von *EcN ΔaroA* zu beobachten war. Dies entsprach in etwa einer Anzahl von 45 Bakterien pro Zelle. Die Ergebnisse zeigten außerdem eine tendentielle, aber nicht signifikante Erhöhung der Infektionsrate bei einer geringen Anzahl von *EcN* ($3,7 \times 10^6$ Bakterien/Loch).

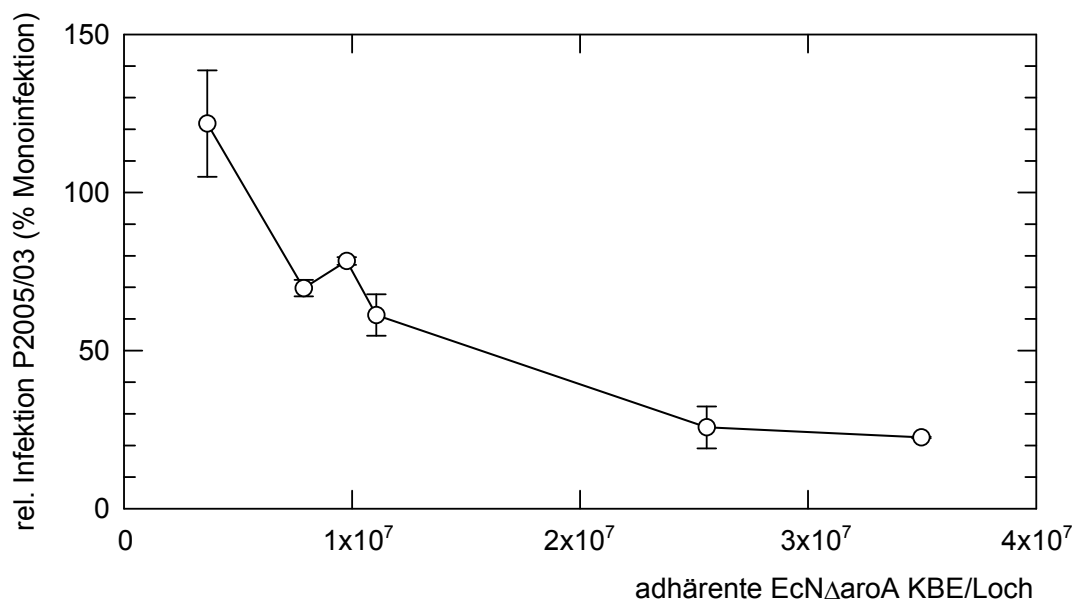


Abb. 34: Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von *EcN ΔaroA* in Abhängigkeit von der Adhäsionsstärke von *EcN ΔaroA*

Die Infektion von IPEC-J2 ($1,3 \times 10^5$ Zellen/Loch) erfolgte über 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in aroAS-Mangelmedium. *EcN ΔaroA* wurde mit unterschiedlicher MOI vorinkubiert. Da die MOI nicht die tatsächliche Anzahl adhärenter Bakterien wiedergab, wurden die Infektionsraten von P2005/03 in Relation zur Anzahl adhärenter *EcN ΔaroA* zu Infektionsende gesetzt. Die Daten sind angegeben in Relation zur Monoinfektion von P2005/03 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. KBE: koloniebildende Einheiten

4.4 Charakterisierung des stimulierenden Effektes von EcN auf die aEPEC-Infektion bei Nachinkubation

Wie in Kapitel 4.2.1 dargestellt, erhöhte die Nachinkubation von EcN die Infektionsrate von P2005/03. Um zu überprüfen, ob diese Erhöhung auf eine Stimulation des Wachstums von P2005/03 im Zellkulturüberstand zurückzuführen war, wurde analog zur Vorinkubation von EcN das Wachstum von P2005/03 im Zellkulturüberstand infizierter IPEC-J2-Zellen überprüft (4.3.1). Hierbei stellte sich heraus, dass P2005/03 nach 3 h ein um 14 % erhöhtes Wachstum aufwies. Dieser Unterschied zeigte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,162$).

Anhand konfokaler Laserscanningmikroskopischer und Rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen konnte nachgewiesen werden, dass sich der stimulierende Effekt von EcN auf die aEPEC-Infektion in erster Linie durch eine Erhöhung der Adhäsion von aEPEC auszeichnet (4.2.2). Um zu überprüfen, inwieweit Adhäsionsfaktoren von EcN diesem Effekt z. B. durch kompetitive Exklusion entgegenwirken oder aber z. B. durch Stimulation der Bildung von Oberflächenrezeptoren auf IPEC-J2 unterstützen, wurden die Fimbrien-Mutanten von EcN (EcN Δfoc , EcN Δfim , EcN $\Delta focfim$) sowie die Flagellen-Mutante EcN $\Delta fliA$ in Nachinkubationsexperimenten eingesetzt. Auf Koinkubationsexperimente wurde verzichtet, da der stimulierende Effekt hier ähnlich, aber sehr viel weniger ausgeprägt war als bei der Nachinkubation von EcN.

Die Ergebnisse in Abb. 35 zeigen, dass EcN bei Verlust der F1C-Fimbrien die aEPEC-Infektion nicht mehr stimulierte. Die Nachinkubation von EcN Δfoc und EcN $\Delta focfim$ resultierte in leicht verringerten, aber nicht signifikant verschiedenen Infektionsraten von P2005/03 (EcN Δfoc : -16 %, $p=0,180$; EcN $\Delta focfim$: -8 %, $p=0,393$). Im Gegensatz dazu erhöhte die Nachinkubation von EcN Δfim die Infektionsrate deutlich um 94 % ($p=0,016$), ähnlich wie der EcN-Wildtyp (+74 %, $p=0,008$). EcN und EcN Δfim unterschieden sich hierbei signifikant von EcN Δfoc ($p=0,027$ bzw. $0,043$). Die Deletion der H1-Flagellen in EcN führte nur zu einer leichten Verringerung des stimulierenden Effektes von EcN auf die aEPEC-Infektion. Dennoch zeigte die Nachinkubation von EcN $\Delta fliA$ einen signifikanten Anstieg um 34 % ($p=0,036$).

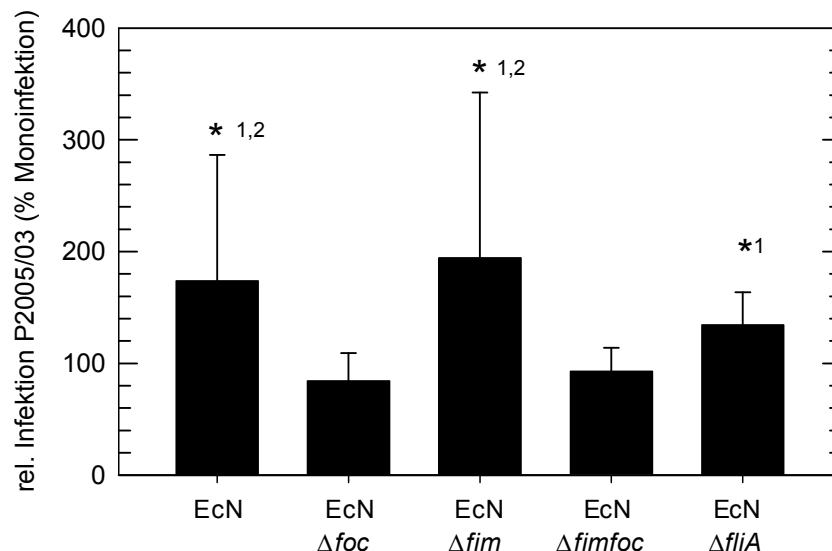


Abb. 35: Infektionsraten von P2005/03 an IPEC-J2 bei Nachinkubation von der Fimbrienmutanten sowie der Flagellenmutante von EcN

Die Infektion von P2005/03 auf IPEC-J2 erfolgte für 6 h mit MOI 100 bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS (12-Loch-Zellkulturplatten). Die Daten sind angegeben in Relation zur Monoinfektion von P2005/03 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$, ¹ vs. Monoinfektion, ² vs. EcN Δf_{oc}

4.5 Einfluss von EcN auf die Sezernierung virulenzassoziierter Proteine durch EPEC

Die Anheftung von EPEC an die Epithelzelloberfläche und die Ausbildung von A/E-Läsionen bedarf einer Vielzahl virulenzassoziierter Proteine, die entweder zur Epithelzelloberfläche hin oder ins Zytosol der Zelle transloziert werden. Dazu dient den Bakterien ein Typ 3-Sekretionssystem. Wird die Sezernierung dieser Proteine inhibiert, sind die Bakterien nicht mehr in der Lage, die Epithelzellen zu infizieren (Jarvis et al., 1995). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob EcN diesen Virulenzmechanismus hemmt und so die aEPEC-Infektion inhibiert. Beispielhaft wurden 3 für die Adhäsion von EPEC und Ausbildung von A/E-Läsionen essentielle sezernierte Proteine untersucht, EspA, EspB und Tir. EspA ist als röhrenförmige Verlängerung des Typ 3-Sekretionsapparates wichtig für die initiale Adhäsion sowie die Translokation von Effektorproteinen in die Wirtszelle (Cleary et al., 2004; Daniell et al., 2001; Ebel et al., 1998; Knutton et al., 1998). EspB ist an der Porenbildung in der Wirtszellmembran beteiligt und ebenfalls Voraussetzung für die Translokation von Effektorproteinen. Das Protein ist außerdem als Effektor an der Zerstörung der Mikrovilli beteiligt (Ide et al., 2001; Izumi et al., 2007). Tir fungiert nach Translokation ins Cytosol der Wirtszelle und Integration in die Zellmembran als Rezeptor für das Adhäsin Intimin und

vermittelt die enge und feste Bindung der Bakterien an die Wirtszelle sowie die Podestbildung (Jerse et al., 1990; Kenny et al., 1997).

Der aEPEC-Stamm P2005/03 sezernierte in DMEM/HAM'S nur sehr geringe Mengen an Proteinen, die für eine Analyse nicht ausreichten. Die Annahme, die Sezernierung könne von einem eukaryotischen Signal abhängen, bestätigte sich nicht, da P2005/03 auch in der Zellkultur mit IPEC-J2 nur geringste Mengen sezernierte. Aus diesem Grund wurde für die Proteinanalysen der humane EPEC-Stamm E2348/69 (O127:H6) verwendet, für den die vermehrte Sezernierung von Proteinen in DMEM/HAM'S beschrieben wurde (Kenny und Finlay, 1995; Knutton et al., 1998).

Um die Ergebnisse der Proteinanalysen mit dem inhibierenden Effekt von EcN auf die EPEC-Infektion vergleichen zu können, wurde zunächst im Infektionstest (3.2.6) überprüft, ob EcN die Infektion von IPEC-J2 mit E2348/69 im gleichen Maße beeinflusst wie die Infektion mit P2005/03. Es zeigte sich, dass E2348/69 die IPEC-J2-Zellen wesentlich schneller und stärker infizierte als P2005/03. Bei Verwendung von MOI 100 in 12-Loch-Zellkulturplatten ($2,58 \times 10^7$ IPEC-J2-Zellen/Loch) betrug die Zahl adhärenter Bakterien von E2348/69 nach 3 h im Durchschnitt $1,2 \times 10^7 \pm 3,7 \times 10^6$ Bakterien/Loch, von P2005/03 nach 6 h im Durchschnitt nur $7,3 \times 10^4 \pm 6,2 \times 10^4$ Bakterien/Loch. Trotzdem wurde die Infektion von E2348/69 durch Vorinkubation von EcN ebenfalls drastisch um 77 % gehemmt ($p=0,001$) (Abb. 36). Die wenig adhärenenten Stämme MG1655 und IMT13962 hatten keinen Einfluss auf die Infektionsrate von E2348/69. Die für P2005/03 beobachtete Stimulation der Infektion bei Nachinkubation von EcN wurde für E2348/69 nicht bestätigt.

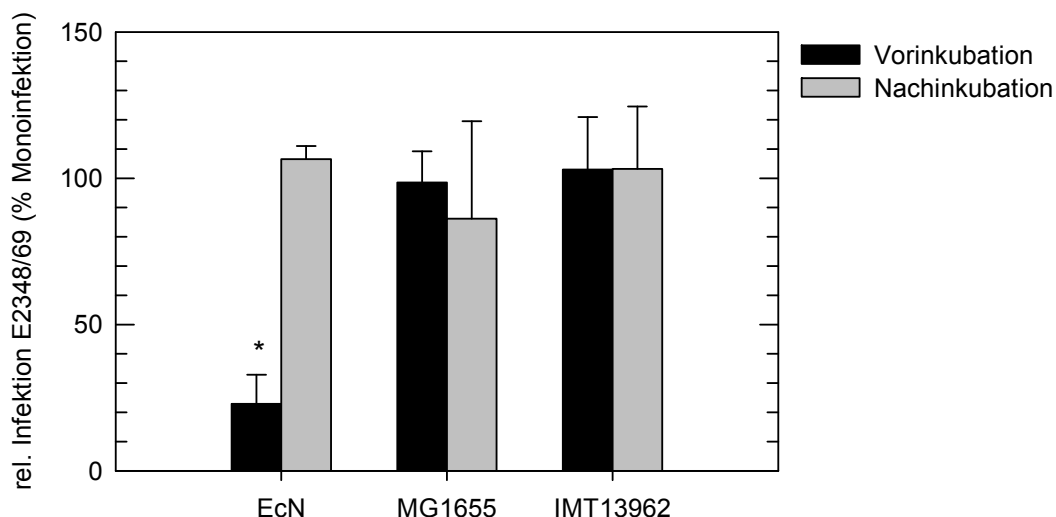


Abb. 36: Infektionsraten von E2348/69 an IPEC-J2 bei Vor- und Nachinkubation von EcN

Die Infektion von IPEC-J2 mit E2348/69 erfolgte mit MOI 100 für 3 h bei 37 °C in DMEM/HAM'S-FKS. Die Daten sind angegeben in Relation zur Monoinfektion von E2348/69 als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Tests. * $p \leq 0,05$ vs. Monoinfektion

Da der inhibierende Effekt von EcN auch für die Infektion mit E2348/68 nachgewiesen wurde, konnte dieser Stamm genutzt werden, um den Einfluss von EcN auf die Sezernierung virulenzassoziierten Proteine durch EPEC zu untersuchen. Dazu wurde E2348/69 in frischem DMEM/HAM'S und in Kulturüberständen von EcN und MG1655 bei 200 rpm und 37 °C bis zur OD₆₀₀ 1,0 angezogen. Die Gewinnung der Kulturüberstände erfolgte aus Kulturen, die ebenfalls in DMEM/HAM'S bei 200 rpm und 37 °C bis zur OD₆₀₀ 1,0 angezogen wurden (3.1.4). Die in den Überstand sezernierten Proteine wurden mittels TCA- und Aceton-Fällung (3.5.1) aufgereinigt und in der SDS-Page (3.5.4) aufgetrennt. Die Proteine wurden unspezifisch mit Hilfe der Silberfärbung (3.5.5) angefärbt oder aber EspA, EspB und Tir mit Hilfe polyklonaler Antiseren (Gemisch aus Anti-EspA, Anti-EspB und Anti-Tir) im Westernblot (3.5.6) nachgewiesen.

Für den Vergleich der sezernierten Gesamtproteinmengen wurden in der SDS-Page als feste Bezugsgröße 10 µg Protein aus Überständen von E2348/69 in DMEM/HAM'S analysiert. Für alle anderen Varianten wurde entsprechend das gleiche Volumen aufgetragen. Da die Proben vor Aufreinigung der Proteine einheitlich auf die gleiche Bakteriendichte eingestellt und für die Aufreinigung gleiche Probenvolumen verwendet wurden, erfolgte so ein Vergleich sezernierter Proteinmengen für eine gleich bleibende Anzahl von Bakterien und nicht der Vergleich identischer Proteinmengen.

Es zeigte sich, dass bei Einsatz des unverdünnten Kulturüberstandes von EcN (100 %) E2348/69 kaum noch Proteine sezernierte (Gesamtproteinmenge <0,1 µg) (Abb. 37, Spur 2). Der unverdünnte Kulturüberstand von MG1655 hatte ebenfalls einen inhibierenden, aber deutlich geringeren Effekt als der Kulturüberstand von EcN (Abb. 37, Spur 6). Bei Verdünnung der Kulturüberstände sowohl von EcN als auch von MG1655 mit DMEM/HAM'S (75 %, 50 %) wurde die Sezernierung von Proteinen hingegen nur gering beeinflusst. Die Gesamtproteinmenge war in 75 %igen Kulturüberständen gegenüber der Gesamtproteinmenge aus DMEM/HAM'S leicht verringert, in 50 %igen Kulturüberständen leicht erhöht (Abb. 37, Spur 3 und 4, Spur 7 und 8).

Der Kulturüberstand von EcN wies gegenüber DMEM/HAM'S und dem Kulturüberstand von MG1655 einen verringerten pH-Wert auf (SN EcN pH 7,3; DMEM/HAM'S / SN MG1655 pH 7,7). Um zu überprüfen, ob die verringerte Sezernierung von Proteinen auf die Absenkung des pH-Wertes zurückzuführen war, wurde der pH-Wert des Kulturüberstandes von EcN korrigiert und ebenfalls unverdünnt für die Anzucht von E2348/69 und Aufreinigung der sezernierten Proteinen verwendet. Hierbei zeigte sich, dass der inhibierende Effekt des 100 %igen Kulturüberstandes von EcN nur zu einem geringen Teil auf die Absenkung des pH-Wertes zurückzuführen war (Abb. 37, Spur 5). EcN und MG1655 sezernierten keine Proteine in den Kulturüberstand (Abb. 37, Spur 9 und 10).

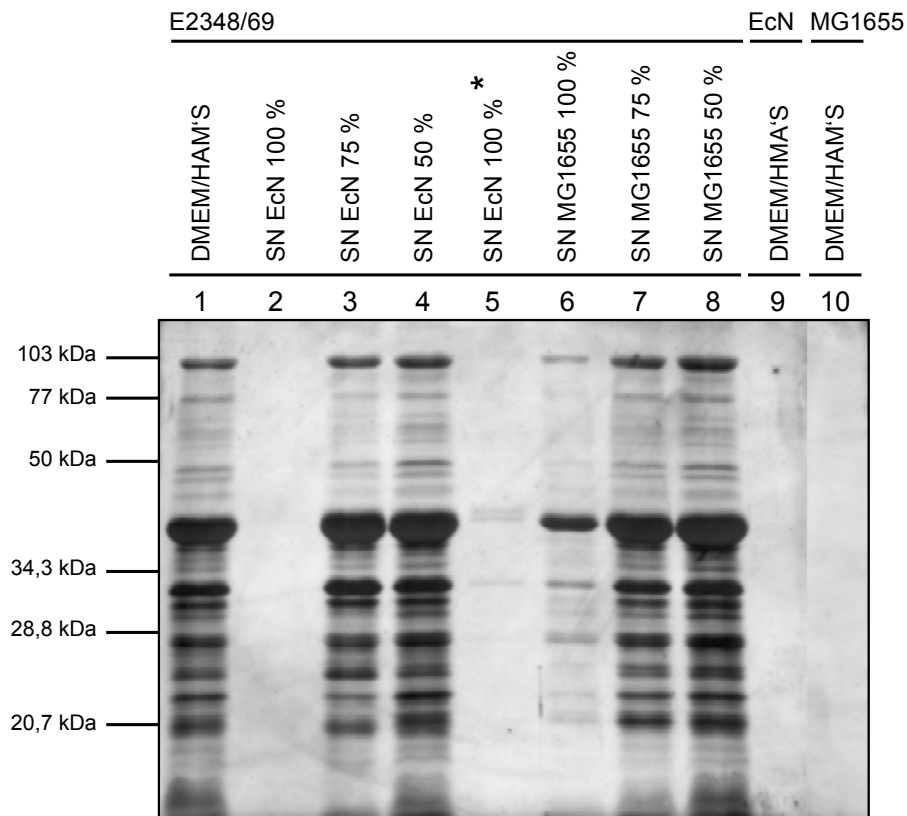


Abb. 37: Nachweis der durch E2348/69 sezernierten Proteine in DMEM/HAM'S und Kulturüberständen von EcN und MG1655 mittels Silberfärbung

E2348/69 wurde bei 200 rpm und 37 °C in DMEM/HAM'S oder in Kulturüberständen (SN) von EcN und MG1655 bis OD₆₀₀ 1,0 angezogen. Die Gewinnung der Kulturüberstände von EcN und MG1655 erfolgte ebenfalls in DMEM/HAM'S und unter den gleichen Kulturbedingungen wie für E2348/69. Sie wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (50 %, 75 %, 100 %). Der Kulturüberstand von EcN wurde zusätzlich pH-korrigiert (*). Die Verdünnung erfolgte in DMEM/HAM'S. Die Überstandsproteine von E2348/69 (Spur 1 bis 8) sowie von EcN (Spur 9) und MG1655 (Spur 10) wurden mittels TCA- und Acetonfällung aufgereinigt und in der SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde jeweils ein Probenvolumen von 10 µl aufgetragen. In Spur 1 entsprach dies einer Gesamtproteinmenge von 10 µg, in Spur 2 bis 10 der Proteinmenge, die durch die gleiche Bakterienanzahl wie in Spur 1 sezerniert wurde. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Silberfärbung. aufgetragene Proteinmengen: 1: 10,0 µg; 2: <0,1 µg; 3: 9,3 µg; 4: 13 µg; 5: <0,3 µg; 6: 3,3 µg; 7: 9,3 µg; 8: 11 µg; 9: <0,1 µg; 10: <0,1 µg

Für die Westernblotanalysen wurde zunächst mit Hilfe einer Konzentrationsreihe der Überstandsproteine von E2348/69 in DMEM/HAM'S die optimale aufzutragende Gesamtproteinmenge und die Nachweisgrenzen für EspA, EspB und Tir im Westernblot ermittelt (Abb. 38). Die aufzutragende Gesamtproteinmenge dieser Probe sollte möglichst hoch sein, da die Proteinmengen für EspA, EspB und Tir aller Proben verglichen und bei einer möglichen Inhibierung der Proteinsezernierung durch EcN oder MG1655 auch noch geringe Mengen nachgewiesen werden sollten. Gleichzeitig sollten die Proteinbanden der

Probe klar voneinander abgrenzbar sein. Es wurde eine optimale Gesamtproteinmenge von 3,0 µg ermittelt und für die Analysen der sezernierten Proteine von E2348/69 in DMEM/HAM'S eingesetzt. Für alle anderen Proben wurde wieder entsprechend dasselbe Probenvolumen eingesetzt, um wie bereits beschrieben, die Sezernierung durch die gleiche Anzahl von Bakterien vergleichen zu können. Die Nachweisgrenzen für EspA und Tir lagen bei 0,5 µg und für EspB bei 0,1 µg Gesamtprotein. Im Westernblot zeigten sich zahlreiche Kreuzreaktionen der Antiseren mit weiteren sezernierten Proteinen, nicht jedoch mit EspA, EspB und Tir. Diese drei Proteine konnten anhand ihrer Molekulargröße eindeutig den entsprechenden Proteinbanden zugeordnet werden.

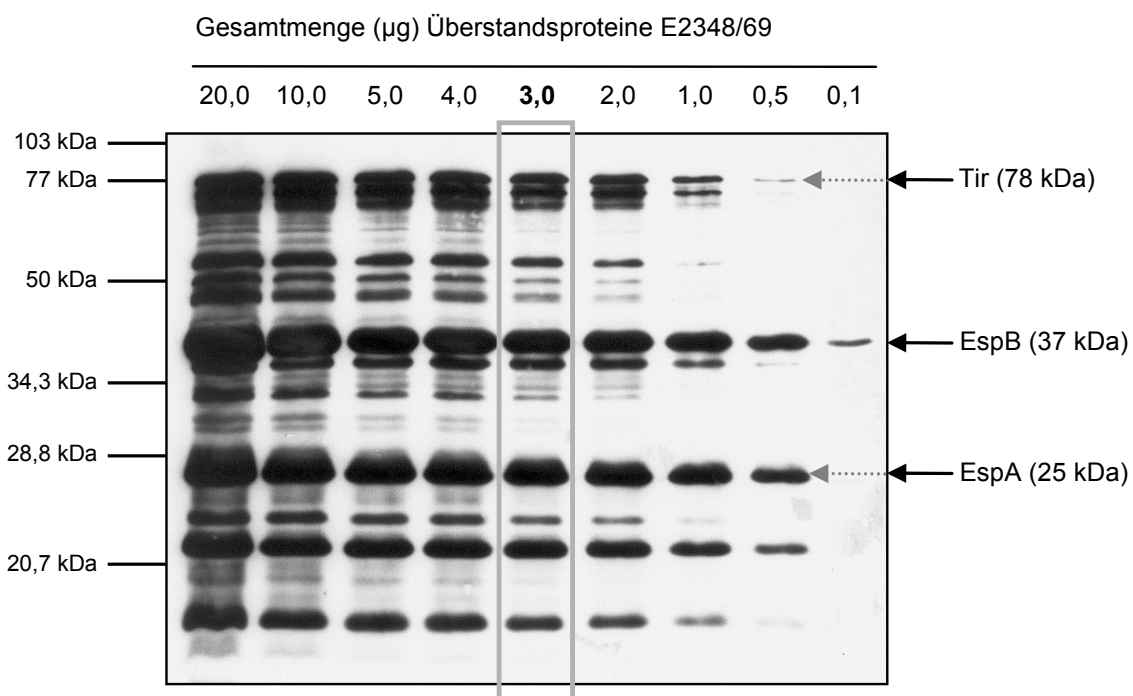


Abb. 38: Nachweisgrenzen der durch E2348/69 in DMEM/HAM'S sezernierten Proteine EspA, EspB und Tir und optimale Auftragsmenge Gesamtprotein im Westernblot

E2348/69 wurde bei 37 °C und 200 rpm in DMEM/HAM'S bis OD₆₀₀ 1,0 angezogen. Die durch E2348/69 in das Kulturmedium sezernierten Proteine wurden mittels TCA- und Acetonfällung aufgereinigt und in einer abfallenden Konzentrationsreihe von 20 µg bis 0,1 µg Gesamtprotein in der SDS Page elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis von EspA, EspB und Tir erfolgte mittels polyklonaler Antiseren im Westernblot. Die optimale, höchstmögliche Auftragsmenge an Gesamtprotein mit eindeutig abgrenzbaren Banden für EspA, EspB und Tir lag bei 3,0 µg (grauer Rahmen).

Die Ergebnisse in Abb. 39 zeigen wie erwartet, dass mit Verringerung des Gesamtgehaltes an sezernierten Proteinen durch E2348/69 in unverdünnten Kulturüberständen von EcN auch die Menge an EspA, EspB und Tir abnahm. Sie lag jeweils unter der Nachweisgrenze (Abb.

39, Spur 2). Durch die Korrektur des pH-Wertes des unverdünnten Kulturüberstandes von EcN nahm dieser inhibierende Effekt nur leicht ab (Abb. 39, Spur 5). Der unverdünnte Kulturüberstand von MG1655 hatte ebenfalls einen inhibierenden, aber deutlich geringeren Effekt als der Kulturüberstand von EcN (Abb. 39, Spur 6). In den verdünnten Kulturüberständen von EcN und MG1655 wurden keine deutlich veränderten Gehalte an EspA, EspB oder Tir verzeichnet (Abb. 39, Spur 3 und 4, Spur 7 und 8).

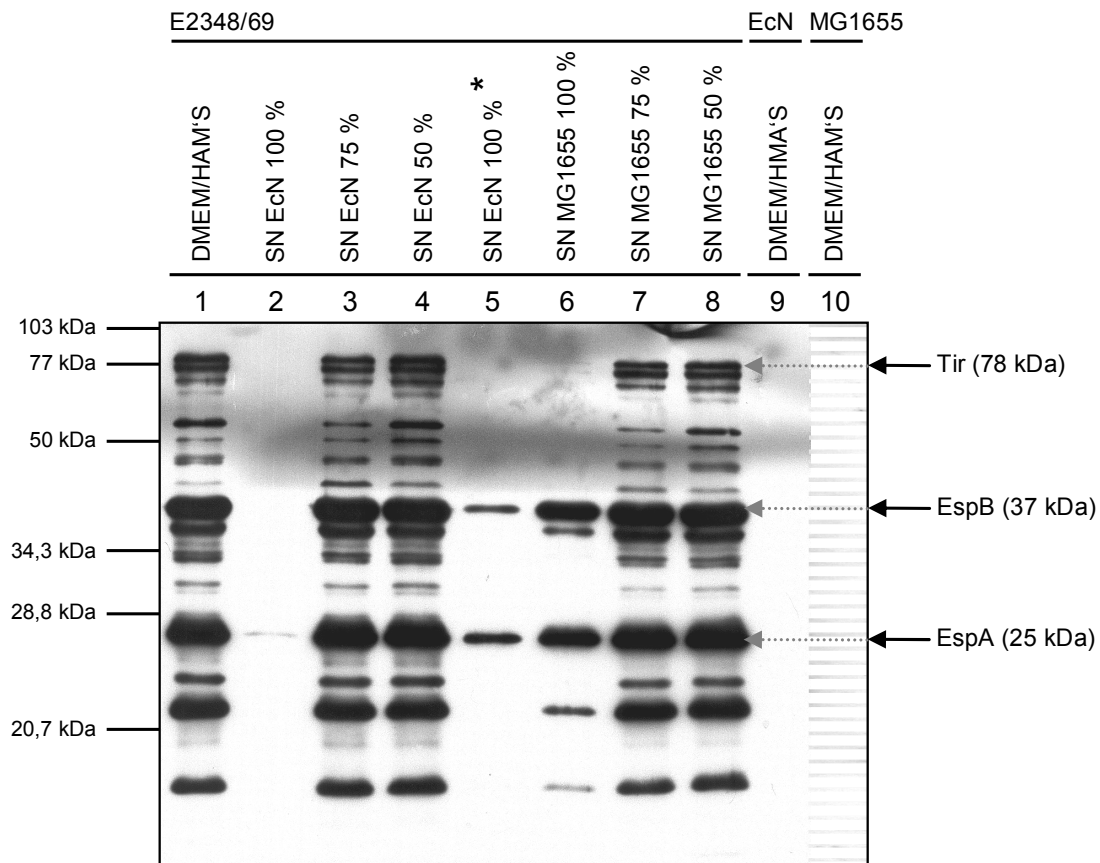


Abb. 39: Nachweis der durch E2348/69 sezernierten Proteine EspA, EspB und Tir in DMEM/HAM'S und Kulturüberständen von EcN und MG1655 mittels Westernblot

E2348/69 wurde bei 37 °C und 200 rpm in DMEM/HAM'S oder in Kulturüberständen (SN) von EcN und MG1655 bis OD₆₀₀ 1,0 angezogen. Die Gewinnung der Kulturüberstände von EcN und MG1655 erfolgte ebenfalls in DMEM/HAM'S und unter den gleichen Kulturbedingungen wie für E2348/69. Sie wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (50 %, 75 %, 100 %). Der Kulturüberstand von EcN wurde zusätzlich pH-korrigiert (*). Die Verdünnung erfolgte in DMEM/HAM'S. Die Überstandsproteine von E2348/69 (Spur 1 bis 8) sowie von EcN (Spur 9) und MG1655 (Spur 10) wurden mittels TCA- und Acetonfällung aufgereinigt und in der SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde jeweils ein Probenvolumen von 5 µl aufgetragen. In Spur 1 entsprach dies einer Gesamtproteinmenge von 3 µg, in Spur 2 bis 10 der Proteinmenge, die durch die gleiche Bakterienanzahl wie in Spur 1 sezerniert wurde. Der Nachweis von EspA, EspB und Tir erfolgte mittels polyklonaler Antiseren im Westernblot. aufgetragene Proteinmengen: 1: 3,0 µg; 2: <0,1 µg; 3: 2,8 µg; 4: 3,9 µg; 5: <0,3 µg; 6: 1,0 µg; 7: 2,8 µg; 8: 3,3 µg; 9: <0,1 µg; 10: <0,1 µg

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die fehlende Sezernierung der Proteine in unverdünnten Kulturüberständen von EcN und MG1655 auf eine Störung des Typ 3-Sekretionssystems und/oder eine inhibierte Expression entsprechender Virulenzgene zurückzuführen war, wurde die Bildung von EspA, EspB und Tir in der Bakterienzelle überprüft. Für einen direkten Vergleich zwischen der Sezernierung der Proteine und der Bildung in der Bakterienzelle wurden die Proteine jeweils aus derselben Ausgangsprobe aufgearbeitet (3.5.2) und mittels SDS-Page (3.5.4) und Westerblot (3.5.6) analysiert. Die Proteingesamtmenge entsprach dabei wieder einer gleich bleibenden Anzahl an Bakterien. Wie in Abb. 40 zu erkennen, wurden durch die polyklonalen Antikörper gegen EspA, EspB und Tir auch in den Bakterien eine weitaus größere Anzahl an Proteinen detektiert. Durch den direkten Vergleich des Bandenmusters mit dem der Überstandsproteine von E2348/69 konnten die entsprechenden Banden für die gesuchten Proteine jedoch zugeordnet werden (Abb. 40, Spur 9). Dabei zeigte sich, dass in Bakterienzellen von E2348/69, welche in unverdünnten Kulturüberständen von EcN und MG1655 gewachsen waren, deutliche Mengen an EspA, EspB und Tir nachzuweisen waren. Diese Mengen waren jedoch, verglichen zu den Proteinsmengen von Bakterien, die in DMEM/HAM'S (Abb. 40, Spur 1) oder in verdünnten Kulturüberständen gewachsen waren (Abb. 40, Spur 3 und 4, Spur 7 und 8), leicht verringert (Abb. 40, Spur 2, 5 und 6). Auch hier war der inhibierende Effekt von EcN stärker als von MG1655. Die Absenkung des pH-Wertes im Kulturüberstand von EcN hatte keinen Effekt auf die Bildung von EspA, EspB und Tir (Abb. 40, Spur 5).

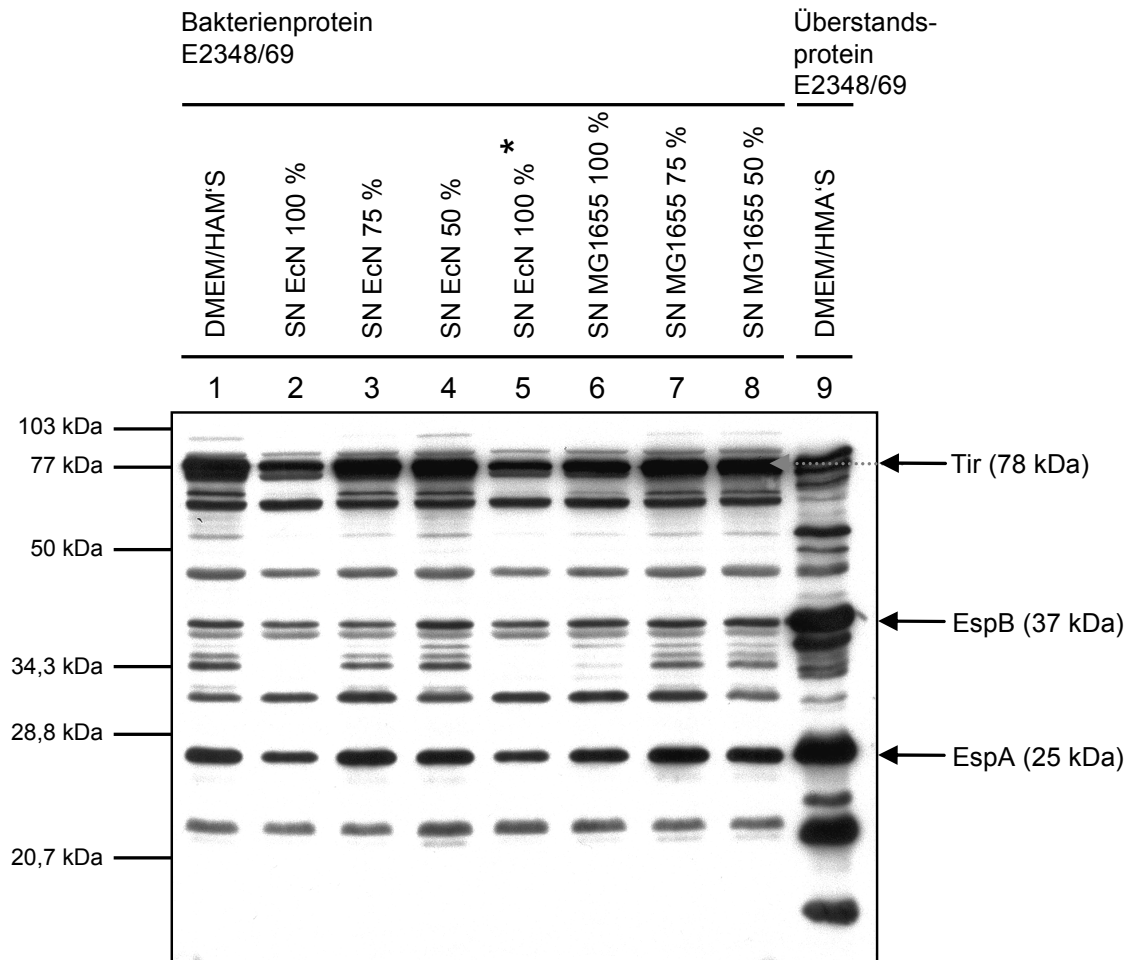


Abb. 40: Nachweis der virulenzassoziierten Proteine EspA, EspB und Tir in Bakterien von E2348/69 nach Anzucht in DMEM/HAM'S und Kulturüberständen von EcN und MG1655 mittels Westernblot

E2348/69 wurde bei 37 °C und 200 rpm in DMEM/HAM'S oder in Kulturüberständen (SN) von EcN und MG1655 bis OD_{600} 1,0 angezogen. Die Gewinnung der Kulturüberstände von EcN und MG1655 erfolgte ebenfalls in DMEM/HAM'S und unter den gleichen Kulturbedingungen wie für E2348/69. Sie wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (50 %, 75 %, 100 %). Die Verdünnung erfolgte in DMEM/HAM'S. Der Kulturüberstand von EcN wurde zusätzlich pH-korrigiert (*). Die Bakterienproteine von E2348/69 wurden aus den gleichen Ausgangsproben gewonnen wie die Überstandsproteine (Abb. 39). Je 1 ml der Kulturen wurde zentrifugiert, die Bakterien in 50 μ l 4xProbenpuffer aufgeschlossen und die Proteine 5 min bei 99 °C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der SDS-Page nach Auftrag von jeweils 5 μ l Probe (1:1 verdünnt). Dies entsprach der Proteinmenge aus ca. $2,5 \times 10^7$ Bakterien. Der Nachweis von EspA, EspB und Tir erfolgte mittels polyklonaler Antisera im Westernblot.

5 Diskussion

Durch enteropathogene Bakterien ausgelöste Durchfallerkrankungen stellen bei Mensch und Tier gleichermaßen wichtige intestinale Erkrankungen dar. Beim Schwein wird die Mehrzahl dieser Infektionen durch pathogene *E. coli* verursacht. Bei Absetzferkeln führen häufig Infektionen mit atypischen enteropathogenen *E. coli* (aEPEC) zu schweren akuten Durchfällen (Bertschinger und Fairbrother, 1999; Zhu et al., 1994). Die Tiere sind in dieser Lebensphase durch die Nahrungsumstellung und der damit verbundenen Dysbiose der Mikrobiota sowie weiteren Stressoren besonders anfällig gegenüber Infektionen (Hopwood und Hampson, 2003). Aufgrund ihrer stabilisierenden Wirkung auf die Mikrobiota und Abwehrfunktion des Darmes könnten Probiotika eine Möglichkeit der Prävention und Therapie von aEPEC-Infektionen beim Schwein darstellen. Der probiotische *E. coli*-Stamm Nissle 1917 (EcN) wird beim Menschen erfolgreich gegen eine Vielzahl gastrointestinaler Beschwerden eingesetzt, darunter akute unspezifische Durchfälle und chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Henker et al., 2008; Krammer et al., 2006; Kruis et al., 2004; Schultz et al., 2004). Beim Schwein konnte gezeigt werden, dass EcN bei präventiver Gabe die Infektion mit enterotoxischen *E. coli* verhinderte (Schroeder et al., 2006). Dass EcN auch einen stark inhibierenden Effekt auf invasive enteropathogene Bakterien hat, zeigten in vitro-Untersuchungen an humanen Zelllinien (Altenhoefer et al., 2004; Boudeau et al., 2003). Der zugrunde liegende Mechanismus ist bisher nicht aufgeklärt. Darüber hinaus existieren keine Untersuchungen zur Wirkung von EcN auf EPEC/aEPEC, weder beim Menschen noch beim Schwein. Dies war Anlass zur vorliegenden Arbeit, die sich in einem porcinen in vitro-Modell mit dem Einfluss von EcN auf die Infektion mit atypischen EPEC beschäftigte.

5.1 Inhibierender Effekt von EcN auf die aEPEC-Infektion im IPEC-J2-Modell

In vitro-Untersuchungen an der humanen intestinalen Epithelzelllinie INT407 belegen, dass EcN bei Koinkubation die Invasion von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* und *Listeria monocytogenes* (Altenhoefer et al., 2004) sowie bei Vor- und Koinkubation die Invasion von adhären-invasiven *E. coli* (AIEC) hemmt (Boudeau et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei Vorinkubation von EcN in vitro auch die Infektion durch nicht invasive, atypische enteropathogene Bakterien an porcinen Darmepithel drastisch reduziert wird.

Die Infektion von Epithelzellen durch EPEC ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, der zunächst durch eine lose Anheftung der Bakterien auf der Epithelzelloberfläche gekennzeichnet ist (initiale Adhäsion). Im Anschluss wird mit Hilfe eines Typ 3-Sekretionssystems neben wichtigen Effektorproteinen der Rezeptor Tir (*Translocated intimin receptor*)

in die Wirtszelle transloziert. Erst nach Integration von Tir in die Zellmembran und Präsentation des Intimin-bindenden Epitops auf der Epithelzelloberfläche erfolgt mit Hilfe des Intimin-Tir-Komplexes die sehr enge Bindung der Bakterien an die Epithelzelle und die Ausbildung von *Attaching and Effacing*-Läsionen (A/E-Läsionen) mit typischer Podestbildung und Zerstörung der Mikrovilli im angrenzenden Bereich (Cleary et al., 2004; Jerse et al., 1990; Kenny et al., 1997; Knutton et al., 1998; Nataro und Kaper, 1998). Das Wissen darum, in welche Schritte der EPEC/aEPEC-Infektion EcN eingreift, trägt wesentlich zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von EcN bei. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe konfokaler Laserscanningmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie gezeigt, dass EcN bei Vorinkubation die Adhäsion und die Mikrokoloniebildung von aEPEC reduziert. Der verbleibende Anteil adhärenter aEPEC-Bakterien bindet aber eng an die Epithelzelloberfläche und bildet A/E-Läsionen aus. Aufgrund dieser Ergebnisse wird geschlussfolgert, dass EcN bei Vorinkubation zu einem sehr frühen Zeitpunkt in die Interaktion von aEPEC mit den Epithelzellen eingreift und dessen initiale Anheftung unterbindet. Boudeau et al. (2003) verwiesen darauf, dass EcN in vitro nicht nur die Invasion, sondern auch die Adhäsion adhärent-invasiver *E. coli* hemmt. Da die Adhäsion grundlegende Voraussetzung für die Invasion von Epithelzellen durch Pathogene ist, stellt ihre Hemmung einen möglichen und effektiven Wirkungsmechanismus für EcN gegen invasive und nicht invasive Pathogene dar. Bei der Quantifizierung der A/E-positiven Mikrokolonien zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass etwa 50 % der vereinzelt adhärenten Bakterien ohne Einfluss von EcN keine A/E-Läsionen ausbildeten. Ursache hierfür ist vermutlich, dass sich die Bakterien während der Infektion im Kulturüberstand und auf den Epithelzellen vermehren bzw. sich aus Mikrokolonien ablösen und die Epithelzellen neu infizieren. Dadurch treten zeitgleich verschiedene Stadien der Infektion auf. Die Tatsache, dass ausschließlich vereinzelt adhärenente Bakterien keine A/E-Läsion aufwiesen, deutet auf ein frühes Infektionsstadium hin und bestätigt diese Annahme. Der relative Anteil A/E-negativer Bakterien an vereinzelt adhärenenten Bakterien erhöhte sich unter Einfluss von EcN nicht und weist darauf hin, dass EcN nicht in diesen Prozess der A/E-Bildung adhärenenter Bakterien eingreift. Die erhöhte absolute Anzahl der vereinzelt adhärenenten aEPEC-Bakterien ist vielmehr ein Hinweis darauf, dass die Vorinkubation von EcN zu einer zeitverzögerten Adhäsion von aEPEC führt.

Altenhoefer et al. (2004) zeigten in vitro durch Transwellmembranversuche, dass eine Infektion durch invasive Pathogene verringert wurde, obwohl lebende EcN keinen direkten Kontakt zu Epithelzellen hatten. Durch Hitze oder UV-Strahlung abgetötete EcN mit der Möglichkeit zum direkten Kontakt inhibierten die Infektion im Gegensatz dazu nicht mehr. Die Autoren schlossen deshalb auf die Abgabe eines Inhibitors in das Kulturmedium. Der gleiche inhibierende Effekt auf nicht invasive Pathogene konnte in der vorliegenden Arbeit durch Koinkubation des sterilfiltrierten Kulturüberstandes von EcN erreicht werden. Es ist deshalb

davon auszugehen, dass der inhibierende Effekt von EcN auf die aEPEC-Infektion ebenfalls auf die Abgabe eines Faktors in den Kulturüberstand zurückzuführen ist. Dieser Faktor scheint die Bakterien direkt zu beeinflussen und nicht über eine Modulation der Epithelzellen zu wirken, da die Vorinkubation der Kulturüberstände die aEPEC-Infektion nicht veränderte.

Um einschätzen zu können, ob es sich bei der Inhibierung der aEPEC-Infektion durch EcN um einen spezifischen Effekt handelte, wurde ein Vergleich mit zwei weiteren *E. coli*-Stämmen, MG1655 und IMT13962, durchgeführt. Beide Stämme waren bei Vorinkubation nicht in der Lage, die aEPEC-Infektion zu hemmen. Im Gegensatz dazu erzielte jedoch die Koinkubation ihrer Kulturüberstände (OD_{600} 1,0) den gleichen Effekt wie die Vorinkubation von Bakterien von EcN bzw. die Koinkubation seines Kulturüberstandes (OD_{600} 1,0). Demnach gaben beide Stämme wie EcN einen auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkenden Faktor ins Kulturmedium ab. Der Faktor scheint damit nicht spezifisch für EcN, sondern möglicherweise ein Charakteristikum vieler *E. coli*-Stämme zu sein. Das Ergebnis deckt sich nicht mit den Angaben von Altenhoefer et al. (2004), nach denen die inhibierende Wirkung auf enteroinvasive Pathogene nur für EcN nachgewiesen werden konnte. In der genannten Untersuchung wurde jedoch der *E. coli* K-12-Stamm DH5 α als Vergleichsstamm zu EcN ausgewählt. Eigene Versuche mit diesem Stamm zeigten, dass sein Wachstum in LB als auch in DMEM/HAM'S-FKS extrem langsam verläuft. In Transwellmembranversuchen könnte der Stamm nur geringe Mengen eines Inhibitors ins Zellkulturmedium abgeben und somit keinen Effekt auf die Invasion von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium haben. Der Stamm scheint daher als Vergleichsstamm ungeeignet.

Es stellt sich dennoch die Frage, warum bei Vorinkubation der Bakterien die Vergleichsstämme MG1655 und IMT13962 nicht in der Lage waren, die aEPEC-Infektion zu hemmen. Eine Erklärung für die scheinbare Diskrepanz zur Wirkung ihrer Kulturüberstände liefert die sehr gute Adhäsion von EcN an IPEC-J2. Diese Fähigkeit ist ein besonderes Merkmal von EcN und fehlt MG1655 und IMT13962. Da nach Vorinkubation alle nicht adhärenen Bakterien unmittelbar vor der Infektion abgewaschen wurden, verblieb nur vom sehr gut adhärenen Stamm EcN eine hohe Anzahl von Bakterien in der Zellkultur. Diese Bakterien vermehrten sich im Anschluss während der aEPEC-Infektion weiter und konnten so den inhibierenden Faktor in den Zellkulturüberstand abgeben.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Dosisabhängigkeit des inhibierenden Effektes von EcN nachgewiesen werden. Mit steigender Anzahl adhärenter Bakterien von EcN erhöhte sich der inhibierende Effekt auf die aEPEC-Infektion. Es wurde ein Schwellenwert von ca. 45 adhärenen Bakterien von EcN pro Epithelzelle zu Infektionsende ermittelt. Ab diesem Wert war eine hemmende Wirkung zu verzeichnen. Sowohl Altenhoefer et al. (2004) als auch Boudeau et al. (2003) verwiesen in ihren Untersuchungen ebenfalls auf eine dosisabhängige

Wirkung von EcN. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gaben Boudeau et al. (2003) jedoch einen Wert von 5 bis 10 Bakterien an. Die Abweichungen könnten auf die unterschiedliche Größe der verwendeten Epithelzellen oder auch auf unterschiedliche Testverfahren mit verschiedenen definierten Inkubationszeiten zurückzuführen sein. Aber auch eine unterschiedlich starke Wirkung von EcN auf extrazelluläre und invasive Pathogene ist nicht auszuschließen.

5.2 Adhäsionsfaktoren von EcN und ihre Bedeutung für den inhibierenden Effekt im IPEC-J2-Modell

5.2.1 Fimbrien und nicht-fimbriale Adhäsine

Da gezeigt wurde, dass EcN einen inhibierenden Faktor in den Kulturüberstand abgibt, ist die gute Adhäsionsfähigkeit von EcN an IPEC-J2 nicht direkte Ursache für die Inhibierung der aEPEC-Infektion. Sie könnte aber diesen Effekt vermitteln und dadurch wesentlich zum probiotischen Charakter von EcN beitragen. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, welche bakteriellen Adhäsine für die Anheftung von EcN an IPEC-J2 eine Rolle spielen. Der Stamm ist in der Lage, drei verschiedene Fimbrientypen auszubilden: Typ 1-, F1C- und Curli-Fimbrien. Darüber hinaus wurde die genetische Determinante für das nicht-fimbriale Adhäsine Iha (*iron-regulated gene A homologue adhesin*) nachgewiesen (Blum et al., 1995; Grozdanov et al., 2004). Es gibt bisher keinerlei Untersuchungen zur Bedeutung der einzelnen Adhäsine bei der Adhäsion von EcN in vivo oder in vitro. Altenhoefer et al. (2004) schlossen aber eine Bedeutung der Fimbrien für den inhibierenden Effekt von EcN auf invasive pathogene Bakterien wie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium aus.

Typ 1-Fimbrien (kodiert durch das *fim*-Operon) werden von der Mehrzahl der *E. coli*-Stämme aber auch anderen Vertretern der *Enterobacteriaceae* gebildet und binden an α -D-Mannosereste von Oberflächenrezeptoren unterschiedlicher eukaryotischer Zelltypen (Ofek und Doyle, 1994). Sie vermitteln nicht nur die Adhäsion kommensaler *E. coli* im Darm (Hendrickson et al., 1999), sondern sind insbesondere auch am Infektionsprozess einiger intestinaler und extraintestinaler pathogener *E. coli* beteiligt. Hinreichend belegt ist so z. B. die Rolle von Typ 1-Fimbrien bei der initialen Etablierung von Harnwegsinfektionen durch uropathogene *E. coli* (UPEC) (Connell et al., 1996; Martinez et al., 2000; Snyder et al., 2004) sowie als Virulenzfaktor adhären-invasiver *E. coli* (AIEC) im Darm (Boudeau et al., 2001). In beiden Fällen tragen Typ 1-Fimbrien zur Adhäsion der Bakterien an Epithelzellen bei und sind durch Induktion von Membranelongationen in den Invasionsprozess dieser Pathogene involviert.

F1C-Fimbrien hingegen (kodiert durch das *foc*-Operon) werden von 14 % bis 27 % der UPEC-Stämme gebildet, die auch Typ 1- und P-Fimbrien (kodiert durch das *pap*-Operon, *Pyelonephritis associated pili*) aufweisen und typische Auslöser von Harnwegs- (Cystitis) und Nierenbeckenentzündungen (Pyelonephritis) sind (Pere et al., 1985; Siitonen et al., 1993; Sokolowska-Köhler et al., 1997). Die Rolle der F1C-Fimbrien in der Pathogenese ist bisher nur unzureichend geklärt. Virkola et al. (1988) zeigten beim Menschen, dass über die F1C-Fimbrien eine Bindung an distale Tubuli und Sammelrohre der Niere sowie an vaskuläres Endothel der Niere und der Harnblase erfolgt. Es wird vermutet, dass F1C-Fimbrien ähnlich wie P-Fimbrien v. a. zur Kolonisierung und Persistenz von UPEC-Stämmen im oberen Urinaltrakt (Harnleiter, Niere) beitragen (Snyder et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass EcN in vitro über F1C-Fimbrien an intestinale Epithelzellen anhaftet. Den Typ 1-Fimbrien kommt keine Bedeutung zu, da sich die Bindung von EcN an IPEC-J2 als nicht sensitiv gegenüber α -D-Mannose erwies und nicht durch die Deletion der Typ 1-Fimbrien reduziert wurde.

EcN weist eine große genetische Ähnlichkeit mit dem UPEC-Stamm CFT073 auf (Grozdanov et al., 2004). Deshalb könnte man annehmen, dass die Regulation der Fimbrienbildung in EcN einem ähnlichen Mechanismus unterliegt wie in UPEC-Stämmen. In UPEC-Stämmen interagieren die einzelnen Operone für verschiedene Fimbrientypen direkt miteinander, wodurch zeitgleich nur ein Fimbrientyp gebildet wird (Lindberg et al., 2008; Snyder et al., 2005; Xia et al., 2000). Die Bildung von Typ 1-Fimbrien in UPEC und allgemein in *E. coli*-Stämmen ist phasenabhängig, d. h. die Bakterienzelle bildet entweder Typ 1-Fimbrien oder nicht. Zurückzuführen ist diese Phasenvariation auf die Inversion der Promotorsequenz für *fimA*, die je nach Orientierung die Expression der *fim*-Gene erlaubt oder unterdrückt (*fim switch*). Reguliert wird dieses An- und Abschalten durch die Rekombinasen FimB (An- und Abschalten) und FimE (Abschalten über FimB), deren Bildung wiederum von Umweltbedingungen und weiteren Regulatoren abhängt (Klemm, 1986). Für den UPEC-Stamm CFT073 wurde zusätzlich gezeigt, dass die Regulation des *fim switch* alternativ über die FimB und FimE ähnlichen Rekombinasen IpuA (*Integrase-like protein of uropathogens*, An- und Abschalten) und IpbA (*Inclusion body-associated protein*, Anschalten) erfolgen kann (Bryan et al., 2006). Im Stamm EcN kann der *fim switch* aufgrund einer Mutation des Gens *fimB* (Trunkierung durch Insertion eines ca. 1,9 kb großen Elements) nicht über FimB und FimE reguliert werden. Eine Regulation über alternative Rekombinasen ist wahrscheinlich, da für EcN die Bildung von Typ 1-Fimbrien in statischen Kulturen nachgewiesen wurde. Allerdings erfolgte das Anschalten der Typ 1-Fimbrienbildung über einen relativ langen Inkubationszeitraum von 48 h in nur 10 % bis 50 % der Bakterienzellen (Stentebjerg-Olesen et al., 2000). Deshalb stellt sich die Frage, ob EcN in vitro bei vergleichsweise kurzen Testzeiten überhaupt Typ 1-Fimbrien bilden kann. Sie ist insofern relevant, als dass die

Expression von F1C-Fimbrien in UPEC-Stämmen vom Abschalten der Typ 1- und P-Fimbrienbildung abhängt und vermutlich über den *fim switch* reguliert wird (Lindberg et al., 2008; Snyder et al., 2005; Xia et al., 2000).

In EcN scheint dieser Regulationsmechanismus aufgrund der Mutation des *fimB*-Gens zu fehlen. Eine Regulation der Bildung von F1C-Fimbrien über das *pap*-Operon ist ebenfalls nicht möglich, da dieses in EcN nicht vorhanden ist (Grozdanov et al., 2004). Das lässt den Schluss zu, dass die F1C-Fimbrien für EcN das wichtigste fimbrielle Adhäsins darstellen.

Das Adhäsins Iha wurde bislang in enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen (EHEC) des Serotyps O157:H7 (Tarr et al., 2000), in UPEC (Johnson et al., 2005) sowie in enterotoxischen *E. coli* (ETEC) und mit geringerer Frequenz in aviären *E. coli* (APEC) (Ewers et al., 2007) und porcinen kommensalen *E. coli* (Wu et al., 2007) nachgewiesen. Die Bedeutung des Adhäsins als Kolonisationsfaktor wurde jedoch nur für UPEC-Stämme bei Urinaltraktinfektionen in der Maus bestätigt (Johnson et al., 2005). Curli-Fimbrien werden von *E. coli*, *Salmonella* sp. sowie weiteren Vertretern der *Enterobacteriaceae* gebildet (Barnhart und Chapman, 2006). Wie auch bei anderen Fimbrientypen ist die Rolle von Curli-Fimbrien in vivo nur unzureichend geklärt. Durch in vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass sie zur Aggregation von Bakterien beitragen und somit wichtig für den Aufbau dreidimensionaler Biofilmstrukturen sind (Kikuchi et al., 2005). Sie vermitteln weiterhin die Adhäsion und Internalisation von Bakterien durch Wirtszellen und sind sehr wahrscheinlich mit der Virulenz von Bakterien assoziiert (Kikuchi et al., 2005; Wang et al., 2006). Curli-Fimbrien binden dabei v. a. an das Glykoprotein Fibronektin, welches u. a. Bestandteil der extrazellulären Matrix von Wirtszellen ist (Gophna et al., 2002; Olsén et al., 1993; Olsén et al., 1989). Die Rolle von Curli-Fimbrien und Iha wurde in der vorliegenden Arbeit nicht explizit durch Deletion der entsprechenden Gene untersucht. Da aber die EcN-Mutante für Typ 1- und F1C-Fimbrien (EcN $\Delta fofim$), welche die intakten Gene für Curli-Fimbrien und Iha besitzt, ebenfalls massiv in ihrer Adhäsion eingeschränkt wurde, kann im verwendeten Testsystem eine größere Bedeutung von Curli-Fimbrien und Iha als Adhäsionsfaktoren ausgeschlossen werden.

5.2.2 Flagellen

In der vorliegenden Arbeit konnte für EcN erstmals eine maßgebliche Beteiligung von H1-Flagellen an der Adhäsion nachgewiesen werden. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen adhärenter EcN an IPEC-J2 belegten auf eindrucksvolle Weise, dass sich die Bakterien untereinander mit Hilfe der Flagellen vernetzen. Vereinzelt scheinen die Flagellen zusätzlich als Verankerungsorgan auf der Epithelzelloberfläche zu wirken.

Flagellen ermöglichen es den Bakterien, sich aufgrund von Chemotaxis gerichtet fortzubewegen und aktiv Habitate wie Wirtszelloberflächen zu erschließen und zu

kolonisieren, ohne dass Flagellen als tatsächliches Adhäsion fungieren. Diese Motilität trägt nicht zuletzt deutlich zur Adhäsivität und Invasivität von Pathogenen bei (O'Neil und Marquis, 2006; Ottemann und Miller, 1997; Ramos et al., 2004). Flagellen können zudem eine wichtige Voraussetzung für die Bildung so genannter Biofilme sein, wie z. B. für *Listeria monocytogenes* und *Vibrio cholerae* gezeigt. Sie scheinen auch hier als Fortbewegungs- und Ausbreitungsorgan zu dienen (Lemon et al., 2007; Watnick und Kolter, 1999). Dass Flagellen aber auch direkt wie bei EcN an der Adhäsion von Bakterien an Epithelzellen beteiligt sein können, zeigten Girón et al. (2002) für EPEC an der humanen Epithelzelllinie HeLa. Bei einigen Stämmen wurde nach Anheftung an die Epithelzellen eine Bindung der Bakterien untereinander über Flagellen und teilweise eine Bindung von Flagellen an die Epithelzelloberfläche beobachtet. Aufgereinigte Flagellen selbst waren ebenfalls in der Lage, an die Epithelzellen zu binden. Die Vernetzung über Flagellen trug zur Bildung dreidimensionaler Strukturen der Bakterien bei und bedurfte eines eukaryotischen Signals, wie es auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von EcN auf der humanen Epithelzelllinie CaCo-2 zeigten keine Flagellen an (Ukena et al., 2005). Die Flagellenbildung könnte deshalb von der verwendeten Epithelzelllinie abhängig sein, was auf eine Gewebe- oder Wirtsspezifität hindeuten würde. Aufschluss hierüber könnten weitere Untersuchungen zur Flagellenbildung von EcN auf Epithelzelllinien von verschiedenen Tierspezies und beispielsweise verschiedenen Darmabschnitten geben.

Wie in der vorliegenden Arbeit durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen belegt, nutzt der aEPEC-Stamm P2005/03 (O108:H9) zur Adhäsion an IPEC-J2 keine Flagellen. Girón et al. (2002) verwiesen in ihren Untersuchungen unter anderem auf eine Koregulation der Bildung von Flagellen und *Bundle Forming Pili* (BFP) sowie eine mögliche Beteiligung des auf dem EAF-Plasmid kodierten Regulators PerA. Demnach könnte sich die Bedeutung von Flagellen als Adhäsionsfaktor enteropathogener *E. coli* auf typische EPEC-Stämme beschränken. EHEC-Stämme, denen wie aEPEC das EAF-Plasmid fehlt, zeigten ebenfalls keine Flagellenbildung (Girón et al., 2002).

5.2.3 Bedeutung der Adhäsion via F1C-Fimbrien und H1-Flagellen für den inhibierenden Effekt von EcN

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Adhäsion via F1C-Fimbrien und H1-Flagellen bei Vorinkubation den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion vermittelt. Der Verlust der F1C-Fimbrien führte dazu, dass EcN weder auf der Epithelzelloberfläche anheften (Reduktion um 99,8 %) noch die Infektion des aEPEC-Stammes hemmen konnte. Der Wegfall von Flagellen resultierte hingegen in einer verringerten Adhäsion von nur 50 %. EcN war dabei immer noch in der Lage, die aEPEC-

Infektion bei Vorinkubation zu hemmen, wenngleich in geringerem Ausmaß. Flagellen tragen demnach nur bei Adhäsion via F1C-Fimbrien durch Erhöhung der Adhäsionsrate zum inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion bei. Der Grund hierfür ist, dass die Bakterien mittels F1C-Fimbrien an der Epithelzelloberfläche haften und Flagellen in erster Linie zur Bindung der Bakterien untereinander dienen.

Die dargestellten Ergebnisse unterstützen die These, dass die gute Adhäsionsfähigkeit von EcN bei Vorinkubation die Abgabe eines auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkenden Faktors in den Zellkulturüberstand während der Infektion ermöglicht. Da auch zwei weitere *E. coli*-Stämme, MG1655 und IMT13962, einen solchen Faktor in den Kulturüberstand abgeben, sollte überprüft werden, ob durch Einbringen von F1C-Fimbrien (*foc*-Operon) in diese Stämme sich deren Adhäsionsfähigkeit erhöht und bei Vorinkubation die aEPEC-Infektion gehemmt werden kann. Durch Komplementierung von EcN Δ *foc* mit dem *foc*-Operon sollten zudem polare Effekte der Mutation auf weitere, möglicherweise für die Adhäsion und den inhibierenden Effekt wichtige Gene ausgeschlossen werden.

Die Komplementierung von EcN Δ *foc* und MG1655 gelang nicht. Erfolgreich transformierte Klone von MG1655 behielten das entsprechende Cosmid nicht stabil bei. Da sie ein extrem langsames Wachstum aufwiesen, können die Instabilität und der Verlust des Cosmides wahrscheinlich auf eine hohe metabolische Belastung der Bakterienzelle für die Replikation des ca. 19 kb-großen Mehrfachkopienplasmids zurückgeführt werden.

Die erfolglose Transformation von EcN mit pCosF1C6 könnte darüber hinaus ebenso auf eine Plasmidinkompatibilität hinweisen. Inkompatibilität von Plasmiden entsteht, wenn Plasmide den gleichen Replikationsursprung besitzen. Sie können in der Zelle nicht gleichzeitig existieren, weil aufgrund von in der Zelle vorhandenen Kontrollmechanismen nur eines der Plasmide repliziert werden kann. In EcN sind zwei kleine kryptische Plasmide in hoher Kopienzahl vorhanden, die einen ColE1-ähnlichen bzw. einen ColE2-ähnlichen Replikationsursprung und zudem eine große genetische Stabilität aufweisen (Blum-Oehler et al., 2003). Das Cosmid pCosF1C6 nutzt ebenfalls den ColE1-Ursprung zur Replikation. Um eine mögliche Inkompatibilität zu umgehen, wurde versucht, das *foc*-Operon (ca. 12,5 kb) in den Cosmidvektor pLA2917 (RK-2-Replikationsursprung; (Allen und Hanson, 1985)) zu klonieren. Es konnte kein Cosmid mit stabilem *foc*-Operon generiert werden.

Es gelang jedoch, den Stamm IMT13962 mit dem *foc*-Operon zu komplementieren (IMT13962 pCosF1C6). Und tatsächlich wurde die Adhäsionsfähigkeit des Stammes und sein inhibierender Effekt auf die aEPEC-Infektion durch die Bildung von F1C-Fimbrien auf das Niveau des flagellennegativen EcN-Stammes (EcN Δ *fliA*) angehoben. Zur Ergänzung wurde der UPEC-Stamm RZ525 eingesetzt, der EcN klonal sehr ähnlich ist und neben Typ 1- und P-Fimbrien auch F1C-Fimbrien besitzt (Grozdanov et al., 2004). Der Stamm zeichnete sich durch eine annähernd gleiche Adhäsionsstärke wie EcN Δ *fliA* und IMT13962

pCosF1C6 aus und war ebenfalls in der Lage, bei Vorinkubation die aEPEC-Infektion zu inhibieren. Die Übereinstimmung in der Höhe des inhibierenden Effektes und der damit korrelierenden Anzahl adhärenter Bakterien der drei Stämme bestätigt die in Kapitel 5.1 beschriebene dosisabhängige Wirkung auf die aEPEC-Infektion.

Es wurde nicht untersucht, über welchen Fimbriotyp RZ525 an IPEC-J2 bindet. Für die vorliegende Arbeit stand kein Antikörper zur Verfügung, mit dem F1C-Fimbrien spezifisch hätten nachgewiesen werden können. Es könnte durchaus sein, dass der Stamm Typ 1- oder P-Fimbrien zur Adhäsion nutzt. Das würde bedeuten, dass die Art und Weise der Bindung an Epithelzellen für den inhibierenden Effekt bedeutungslos ist und die unspezifische Adhäsion die Abgabe des inhibierenden Faktors vermittelt. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass anscheinend selbst pathogene *E. coli*-Stämme in vitro die Infektion von aEPEC-Stämmen hemmen können. Das deutet einmal mehr darauf hin, dass der auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkende Faktor von EcN ein Charakteristikum vieler *E. coli*-Stämme sein könnte.

5.3 Diskussion möglicher auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkender Faktoren und Mechanismen von EcN

Als mögliche auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkende Faktoren kommen sowohl von den Bakterien in den Kulturüberstand ausgeschiedene Substanzen als auch bakterielle Zellbestandteile in Frage. Diese können entweder direkt hemmend auf das Pathogen einwirken (Vitalität, Wachstum, Expression von Virulenzfaktoren) oder in die Interaktion des Pathogens mit den Epithelzellen eingreifen (Rezeptorblockierung, Immunmodulation, Veränderungen der Zellmembran). Im Folgenden sollen verschiedene Faktoren diskutiert und in Bezug gesetzt werden zu bisher für EcN beschriebene Wirkungsmechanismen.

5.3.1 Mikroazine und antagonistisch wirkende Stoffwechselprodukte

Viele Bakterienarten sind in der Lage, durch Ausscheidung antibakterieller Substanzen oder antagonistisch wirkender Stoffwechselprodukte Bakterien der gleichen oder einer anderen Art abzutöten oder im Wachstum zu limitieren. Diese Fähigkeit wird als ein möglicher Wirkungsmechanismus von Probiotika diskutiert, da sie im Darm in Konkurrenz um Lebensraum und Nährstoffe wesentlich zur erfolgreichen Kolonisierung beiträgt und pathogene Bakterien gehemmt werden können (Saarela et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb überprüft, ob EcN die Vitalität oder Wachstumsfähigkeit des aEPEC-Stammes P2005/03 und damit auch dessen Infektionsrate an IPEC-J2 herabsetzt. Tatsächlich führten die Vorinkubation von EcN und die Koinkubation des Kulturüberstandes zu einer verringerten Anzahl pathogener Bakterien im Zellkulturüberstand.

Für den Stamm EcN wurde die Bildung von höhermolekularen, antibakteriellen Peptiden (5-10 kDa), den Mikrozininen, beschrieben (Patzner et al., 2003). Mikrozine werden von Arten der Familie der *Enterobacteriaceae* (v. a. *E. coli*) gebildet und wirken in erster Linie gegen eng verwandte Arten. Die Wirkungsmechanismen sind sehr vielschichtig. Sie reichen von der Schädigung von Membranstrukturen bis hin zur Inaktivierung intrazellulärer Enzyme, die für die Struktur oder die Synthese von DNA und RNA verantwortlich sind (Duquesne et al., 2007). Mikrozine sind in das Blickfeld der probiotischen Forschung gelangt, weil viele Durchfallerreger innerhalb der Familie der *Enterobacteriaceae* zu finden sind und Mikrozine deshalb ein potentiell Mittel zur Hemmung dieser Pathogene darstellen könnten. Tatsächlich gelang es Wooley et al. (1999) durch Komplementierung eines avirulenten aviären *E. coli*-Stammes mit dem Mikrozin 24 in vitro das Wachstum von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium und *E. coli* O157:H7 zu inhibieren. Cursino et al. (2006) zeigten sowohl in vitro als auch in vivo in der Maus, dass der probiotische *E. coli*-Stamm H22 das Wachstum von *Shigella flexneri* hemmt und dieser Effekt durch die Bildung von Mikrozin C7 vermittelt wird.

EcN bildet die Klasse II b-Mikrozine H47 und M (Patzner et al., 2003). Das breite Wirkungsspektrum von EcN gegen pathogene Stämme verschiedenster Arten und Gattungen der *Enterobacteriaceae* lässt eine mögliche Beteiligung dieser Mikrozine vermuten. Im Plattenhemmtest wurde in der vorliegenden Arbeit die Bildung von Mikrozininen durch EcN bestätigt. Es konnte jedoch keine antibakterielle Wirkung gegen P2005/03 nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte der aEPEC-Stamm auch in Kulturüberständen der mikrozinnegativen Stämme MG1655 und IMT13962 ein verringertes Wachstum. Aufgrund dessen können Mikrozine als Ursache für die Wachstumsinhibierung im Zellkulturüberstand und eine mögliche Rolle bei der Vermittlung des inhibierenden Effektes auf die aEPEC-Infektion ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von Altenhoefer et al. (2004) überein. Die Autoren zeigten, dass die von EcN gebildeten Mikrozine nicht den probiotischen Effekt von EcN in der humanen intestinalen Epithelzelllinie INT407 vermitteln. Eine mikrozinnegative Mutante von EcN inhibierte die Invasion von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium in gleichem Maße wie der Wildtypstamm.

Das im Infektionstest beobachtete verringerte Wachstum von P2005/03 im Zellkulturüberstand bei Vorinkubation von EcN oder Koinkubation von *E. coli*-Kulturüberständen könnte möglicherweise auf eine Limitierung von Nährstoffen wie Glukose oder Aminosäuren zurückzuführen sein. Zellkulturmedien sind im Allgemeinen auf den geringeren Nährstoffbedarf eukaryotischer Zellen abgestimmt und bieten Bakterien keine optimale Nährstoffversorgung. Dawes et al. (1953) und Freter & Ozawa (1963) zeigten aber, dass das Wachstum von *E. coli* in statischen, synthetischen Medien, in denen nur eine Kohlenstoff-

quelle zur Verfügung steht, nicht durch die Limitierung von Nährstoffen, sondern durch die Anreicherung toxischer Stoffwechselprodukte verringert wird. Im Zellkulturmedium DMEM/HAM'S steht den Bakterien nur Glukose als Nährstoff- bzw. Kohlenstoffquelle zur Verfügung. Glukose wird durch *E. coli* unter aeroben Bedingungen in der Atmung vollständig zu CO₂ und H₂O verstoffwechselt. Unter anaeroben Bedingungen hingegen nutzt *E. coli* zur Energiegewinnung die „gemischte Säuregärung“, in deren Folge es zu einer Anreicherung von kurzkettigen organischen Säuren wie Acetat kommt (Gottschalk, 1986). Acetat hemmt bereits in geringer Konzentration (0,5 g/l) das Wachstum von Bakterien durch Reduktion der RNA-, DNA-, Protein- und Lipidsyntheseraten in der Zelle (Cherrington et al., 1990; Nakano et al., 1997). Da die Infektionstests unter statischen Bedingungen durchgeführt wurden, ist zu vermuten, dass sich der Sauerstoffgehalt in der Zellkultur trotz mikroaerophiler Bedingungen im Brutschrank im Verlauf der Infektion und mit Zunahme der Bakteriendichte deutlich verringerte.

Auf eine mögliche Anreicherung von Säuren weist die beobachtete leichte Azidifizierung des Mediums ca. 2 h nach Infektionsbeginn hin (von pH 7,5 zu Testbeginn auf pH 6,5). Die Absenkung des pH-Wertes war sowohl bei Vorinkubation von EcN und Koinkubation von Kulturüberständen als auch bei Monoinfektion von P2005/03 zu beobachten. Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit pH-Indikatorstreifen (Roth, Karlsruhe), wodurch eine genauere Bestimmung des pH-Wertes nicht möglich war. Die Verfärbung des Indikatorfarbstoffes Phenolrot im Medium zeigte jedoch eine etwas geringere pH-Absenkung bei Monoinfektion an. Luli & Strohl (1990) wiesen darauf hin, dass durch die Pufferung von Medien die Acetatbildung nur zur Absenkung des intrazellulären pH-Wertes der Bakterien führen kann, während extrazellulär im Kulturmedium keine Änderung eintritt. Der Verbrauch von Nährstoffen und eine mögliche Anreicherung von toxischen Stoffwechselprodukten wie Acetat in der Zellkultur wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Azidifizierung als Ursache für die Hemmung des Wachstums von P2005/03 kann deshalb nur vermutet werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich aufgrund des verringerten Wachstums die Infektionsrate von P2005/03 verringerte. Eine Wachstumsinhibierung von 20 % bis 25 % bei Vorinkubation von EcN und 30 % bis 35 % bei Koinkubation der Kulturüberstände erklärt jedoch nicht die Inhibierung der Infektionsrate um über 80 %. Diese starke Inhibierung wurde nicht nur 6 h, sondern auch schon 2 h nach Infektionsbeginn gemessen. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass mindestens ein weiterer Faktor hauptsächlich für den inhibierenden Effekt verantwortlich ist. Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen von Altenhoefer et al. (2004), nach denen die Invasion von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium in INT407-Zellen durch EcN gehemmt wurde, diese Hemmung aber nicht auf eine Azidifizierung des Mediums zurückzuführen war.

5.3.2 Kompetitive Exklusion

Voraussetzung für eine erfolgreiche Infektion von Epithelzellen durch enteropathogene Bakterien ist deren Adhäsion an die Wirtszelloberfläche. Die Bindung der Bakterien erfolgt meist spezifisch durch bakterielle Adhäsine an Rezeptoren der Wirtszellen. Als Rezeptoren dienen v. a. Kohlenhydratanteile der transmembranständigen oder membranassoziierten Glykolipide und Glykoproteine sowie Proteine und Glykoproteine der extrazellulären Matrix. Die Spezifität der Bindung wird dabei durch die Sequenz der Kohlenhydratketten bestimmt (Ofek und Doyle, 1994). Ein potentieller Mechanismus, die Adhäsion zu unterbinden, stellt die Blockierung von Wirtszelloberflächenrezeptoren dar, entweder durch direkte Bindung an gleiche Epitope oder an angrenzende Strukturen (sterische Blockierung). Man spricht hierbei von kompetitiver Exklusion (Collado et al., 2005; Collado et al., 2007; Mack und Lebel, 2004).

Der Einsatz von Kulturüberständen von EcN zeigte in der vorliegenden Arbeit, dass für den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion kein direkter Kontakt von EcN mit der Epithelzelloberfläche nötig ist. Eine Blockierung von Wirtszellrezeptoren als Ursache für die Inhibierung ist trotzdem denkbar, da sich fimbrielle Bestandteile von EcN auch im Kulturüberstand befinden und als potentielle Liganden für die Rezeptoren dienen können. Dies gilt insbesondere für aus Schüttelkulturen gewonnene Kulturüberstände, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Es ist deshalb zu diskutieren, ob durch EcN und aEPEC gleiche oder ähnliche Rezeptorstrukturen auf der Epithelzelloberfläche genutzt werden. In diesem Fall könnte die kompetitive Exklusion Ursache des inhibierenden Effektes sein.

EPEC/aEPEC translozieren ihren eigenen Rezeptor Tir (*translocated intimin receptor*) in die Wirtszelle, welcher nach Integration in die Zellmembran das Adhäsin Intimin bindet und die charakteristische enge Bindung der Bakterien an die Wirtszelle sowie die nachfolgende Ausbildung von A/E-Läsionen vermittelt (Jerse et al., 1990; Kenny et al., 1997). Das Einbringen von Tir in die Wirtszelle erfordert zunächst jedoch die initiale Anheftung. Hierzu scheint EPEC auch Rezeptoren der Epithelzelloberfläche nutzen zu können. Dabei spielt unter anderem das Adhäsin Intimin eine Rolle (Girard et al., 2005). Für die Intimin-Subtypen α , β und γ wurde die Bindung an Nukleolin nachgewiesen (Sinclair und O'Brien, 2004). Nukleolin fungierte dabei nur als Rezeptor, so lange keine Bindung an Tir erfolgte. Diese Tatsache unterstreicht die mögliche Rolle von Nukleolin als Rezeptor bei der initialen Anheftung der Bakterien. Die ebenfalls nachgewiesene Bindungsaffinität von Intimin zu β_1 -Integrinen (Frankel et al., 1996) vermittelt offensichtlich nicht die Adhäsion von EPEC an Epithelzellen (Liu et al., 1999). Neben Intimin vermitteln die durch EPEC gebildeten EspA-Filamente zur Translokation des Rezeptors Tir und verschiedener Effektorproteine die initiale Anheftung (Cleary et al., 2004; Ebel et al., 1998; Knutton et al., 1998). Bisher wurde nicht geklärt, ob EspA tatsächlich selbst als Adhäsion fungiert und an eukaryotische

Rezeptorstrukturen bindet oder die Adhäsion über EspD vermittelt wird. EspD ist zusammen mit EspB an der Porenbildung in der Wirtszellmembran zur Translokation der Effektorproteine in die Wirtszelle beteiligt und interagiert mit EspA (Ide et al., 2001). Daniell et al. (2001) zeigten, dass die Mutation von *espD* die EspA-vermittelte Adhäsion von EPEC an Erythrozyten reduziert. Es ist anzunehmen, dass EspA-Filamente insbesondere eine Rolle für die Adhäsion atypischer EPEC-Stämme spielen, da diese nicht die initiale Anheftung vermittelnden *Bundle Forming Pili* (BFP) bilden (Cleary et al., 2004). Die meisten EPEC-Stämme, einschließlich des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stammes P2005/03, besitzen zudem Typ 1-Fimbrien. Elliott & Kaper (1997) wiesen jedoch für den humanen EPEC-Stamm E2348/69 nach, dass die Typ 1-Fimbrien in vitro keinen Einfluss auf die Adhäsion von EPEC nehmen.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, adhärert EcN im Gegensatz zu P2005/03 über F1C-Fimbrien an IPEC-J2. F1C-Fimbrien weisen eine hohe Bindungsaffinität zu den Glykosphingolipiden Gangliotetraosylceramid (asialo-GM1) und Gangliotriaosylceramid (asialo-GM2) auf (Khan et al., 2000). Das bindende Epitop stellt hierbei die Disaccharidsequenz GalNac β 1-4Gal β dar. F1C-Fimbrien binden außerdem mit geringerer Affinität an weitere Ceramide (Glukosylceramid, β -Galaktosylceramid, Lactosylceramid, Globotriasylceramid, Paraglobosid, Lactotriaosylceramid). Die minimal bindende Sequenz besteht dabei aus an das Ceramid in β 1-Form-gebundener Galaktose (GalCer) oder Glukose (GlcCer) (Khan et al., 2000). Die genannten Ergebnisse basieren auf Dünnschichtchromatographie-Untersuchungen synthetisch hergestellter Glykolipide. Bei Verwendung von Glykolipiden, die aus dem Urinaltrakt von Ratte, Kaninchen und Mensch gewonnen wurden, zeigte sich hingegen nur eine geringe Bindungsaffinität der F1C-Fimbrien zu asialo-GM2, aber eine hohe Affinität zu Galactosylceramid und Globotriaosylceramid. Als bindende Epitope wurden auch hier GalCer und GlcCer angegeben (Bäckhed et al., 2002).

Eigene Untersuchungen mit Antikörpern gegen asialo-GM2 (ab23942, Abcam, Cambridge, UK) weisen auf das Vorhandensein dieser Rezeptoren auf IPEC-J2 hin. Die Blockierung von asialo-GM2 führte jedoch nicht zur Inhibierung der Adhäsion von EcN. Das deutet darauf hin, dass EcN entweder nicht an asialo-GM2 bindet oder dessen Blockierung kompensiert wird durch die Bindung an weitere potentielle Glykosphingolipidrezeptoren. P2005/03 scheint hingegen asialo-GM2 als Rezeptor nutzen zu können. Dessen Adhäsion wurde durch Blockierung des Rezeptors um 40 % inhibiert. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von Jagannatha et al. (1991), in denen die Bindung von EPEC an asialo-GM2 nachgewiesen wurde. Darüber hinaus zeigten die Autoren, dass weitere Glykosphingolipide wie asialo-GM1, Globosid und Lactoneotetraosylceramid als Rezeptoren genutzt werden können. Glykosphingolipide könnten demnach sowohl als Rezeptoren für EcN als auch für P2005/03 dienen.

Die Bindung an Glykosphingolipide wurde auch für eine Reihe anderer pathogener Bakterienstämme beschrieben. Viele Erreger von Atemwegsinfektionen wie *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* oder *Pseudomonas aeruginosa* binden spezifisch an die Kohlenhydratsequenz GalNAc β 1-4Gal (Ahmed et al., 2002; Krivan et al., 1988; Sheth et al., 1994). Neben EPEC nutzen auch andere intestinalpathogene *E. coli* Glykosphingolipide als Rezeptoren. Das Adhäsın CS3 (*coli surface 3*), welches Bestandteil des *Colonization Factor*-Antigens II (CFA II) einiger ETEC-Stämme ist, bindet spezifisch an die Kohlenhydratsequenz GalNAc β 1-4Gal in asialo-GM1 und asialo-GM2 (Wennerås et al., 1995). Die 987P-Fimbrie, ein weiteres Adhäsın einiger ETEC-Stämme, bindet an asialo-GM1, asialo-GM2, Lactosylceramid, Sulfatid und Galactosylceramid (Dean-Nystrom und Samuel, 1994). Die Tatsache, dass auch probiotische Bakterienstämme wie *Bifidobacterium bifidum* EB102 (Mukai et al., 2004), *Bifidobacterium longum* SBT2928 (Fujiwara et al., 1997), *Lactobacillus reuteri* JCM1082 (Mukai et al., 2004) und *Lactobacillus johnsonii* La1 (Neeser et al., 2000) an Glykosphingolipide binden, impliziert einen möglichen Wirkungsmechanismus von Probiotika durch Blockierung der Rezeptorstrukturen für pathogene Bakterien. Die Bindung an gleiche Glykosphingolipidrezeptoren wurde jedoch bisher nicht beschrieben. Für *Bifidobacterium*-Stämme wurde aber die Ausscheidung des Proteins BIF (*Binding Inhibitory Factor*) nachgewiesen, welches die Bindung des CFA II von ETEC-Stämmen an asialo-GM1 und an die intestinale Epithelzelllinie HCT-8 verhinderte (Fujiwara et al., 1997; Fujiwara et al., 1999; Fujiwara et al., 2001). Die Mehrzahl der untersuchten *Bifidobacterium*-Stämme bindet dabei nur mit geringer Affinität an asialo-GM1, was dafür spricht, dass BIF, welches gut an asialo-GM1 bindet, nicht direkt als Adhäsın fungiert. Demgegenüber war aber ein von *Bifidobacterium adolescentis* 1027 aufgereinigtes Adhäsın in der Lage, die Adhäsion von EPEC, ETEC und *Clostridium difficile* an der intestinalen Epithelzelllinie LoVo zu inhibieren (Zhong et al., 2004). Ursache für die Inhibierung war demnach kompetitive Exklusion. Die Rolle von Glykosphingolipiden wurde allerdings nicht überprüft.

Für die Stämme EcN und P2005/03 könnten verschiedenste Glykosphingolipide potentielle Rezeptoren darstellen. Die Bindung erfolgt aber vermutlich aufgrund der verschiedenen Adhäsine mit unterschiedlicher Affinität, wie es in der vorliegenden Arbeit beispielsweise für asialo-GM2 gezeigt wurde. Es ist bisher nicht geklärt, welches Adhäsın von EPEC die Bindung an Glykosphingolipiden vermittelt. Um abschätzen zu können, ob EcN tatsächlich Rezeptorstrukturen für aEPEC auf der Epithelzelloberfläche besetzen kann, sind detaillierte Untersuchungen zur Präsenz dieser Rezeptoren auf IPEC-J2 und die Bindung von EcN und P2005/03 daran nötig.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkende Faktor auch von *E. coli*-Stämmen abgegeben wird, die keine F1C-, sondern Typ 1-

Fimbrien bilden. Da Typ 1-Fimbrien an Mannose und nicht an Galaktose binden (Ofek und Doyle, 1994), scheint eine Blockierung gleicher Rezeptorstrukturen durch Typ 1- und F1C-Fimbrien ausgeschlossen. Das Ergebnis weist darauf hin, dass der inhibierende Effekt nicht über eine Blockierung von Glykosphingolipidrezeptoren vermittelt wird. Den Typ 1-Fimbrien selbst kommt ebenfalls keine Bedeutung zu, da EcN, wie in Kapitel 5.2.1 dargestellt, nicht über Typ 1-Fimbrien an IPEC-J2 bindet. Weiterhin bildet EcN aufgrund der Mutation des Gens *fimB* Typ 1-Fimbrien nur in statischen Kulturen, nicht jedoch in der Schüttelkultur (Stentebjerg-Olesen et al., 2000). Da die auf die aEPEC-Infektion inhibierend wirkenden Kulturüberstände von EcN und den anderen *E. coli*-Stämmen aus Schüttelkulturen gewonnen wurden, scheiden Typ 1-Fimbrien als potentiell inhibierender Faktor aus.

Die Adhäsionsstudien mit der *foc*-Mutante von EcN belegen, dass die Adhäsion von EcN an IPEC-J2 nicht durch Curli-Fimbrien vermittelt wird. Eine mögliche Bildung und Abgabe an das Kulturmedium wurde jedoch nicht überprüft und kann daher nicht ausgeschlossen werden. Die Rolle von Curli-Fimbrien für die Adhäsion von aEPEC ist bislang nicht definiert. Unter der Annahme, dass Curli-Fimbrien die initiale Adhäsion von aEPEC-Bakterien vermitteln könnten, wäre eine Blockierung bindender Rezeptoren auf den Epithelzellen durch von EcN gebildete Curli-Fimbrien denkbar. Die meisten Wildtyp-Stämme von *E. coli* beinhalten in ihrem Genom die genetische Determinante für Curli-Fimbrien, aber längst nicht alle sind in der Lage, diese tatsächlich zu produzieren (Olsén et al., 1989). Für die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme EcN, MG1655, IMT13962 und P2005/03 konnte die genetische Determinante mittels PCR nachgewiesen werden. Im Plattentest bei 37 °C wurden Curli-Fimbrien aber nur von EcN und P2005/03 gebildet (Ergebnisse nicht dargestellt). Da aber auch Kulturüberstände von MG1655 und IMT13962 den inhibierend wirkenden Faktor beinhalten, können Curli-Fimbrien als Ursache für die Inhibierung der aEPEC-Infektion ebenfalls ausgeschlossen werden.

Nicht zuletzt konnte gezeigt werden, dass die Kulturüberstände von EcN, MG1655 und IMT13962 die aEPEC-Infektion nur bei Koinkubation, nicht aber bei Vorinkubation hemmten. Bei Blockierung von Rezeptorstrukturen für aEPEC hätte aufgrund der stabilen Rezeptor-Liganden-Bindung auch die Vorinkubation einen inhibierenden Effekt ausüben müssen, wie es beispielsweise für probiotische *Bifidobacterium*-Stämme gezeigt wurde (Fujiwara et al., 1999; Zhong et al., 2004). Zusammengefasst spricht sowohl der Ausschluss bestimmter Adhäsine als Ursache für eine mögliche Rezeptorblockierung als auch die fehlende Hemmung durch Vorinkubation der Kulturüberstände für einen anderen Mechanismus der Inhibierung als die kompetitive Exklusion.

5.3.3 Modulation der epithelialen Barriere- und Abwehrfunktion

Das intestinale Epithel ist als Grenzfläche zum Darmlumen mit einer Reihe von Werkzeugen ausgestattet, um Pathogene aktiv abzuwehren. Dies beinhaltet neben der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion und der Bildung der Mukusschicht auch die Synthese antibakterieller Peptide. Epithelzellen sind zudem in der Lage, bestimmte Zytokine und Chemokine zu bilden und gezielt Immunreaktionen zu initiieren (Oswald, 2006). Die Stärkung der Barriere- und Abwehrfunktion der Epithelzellen ist deshalb ein weiterer möglicher Wirkungsmechanismus von Probiotika (Mack und Lebel, 2004).

Epitheliale Barrierefunktion

Die Barrierefunktion der Epithelzellschicht wird in erster Linie durch Tight junctions (*Zonula occludens*) aufrechterhalten. Diese stellen den engen Kontakt zwischen den Epithelzellen her und verhindern so einen unkontrollierten parazellulären Stoffdurchfluss und den Durchtritt von Pathogenen und schädlichen Antigenen (Gumbiner, 1993). Verschiedene Studien belegen die Zerstörung der Barrierefunktion durch enteropathogene Bakterien, z. B. EPEC, ETEC, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium oder *Shigella flexneri*. Dabei kommt es zum Abbau der Tight junctions-Komplexe entlang der lateralen Membran und Umverteilung der Tight junctions-Proteine wie Occludin, ZO-1 oder ZO-2 zur infizierten apikalen Membranseite. Der Verlust der Membranintegrität geht einher mit einer verstärkten Permeabilität und führt in vivo zu den bekannten Durchfallsymptomen (Jepson et al., 1995; Muza-Moons et al., 2004; Roselli et al., 2007; Sansonetti et al., 1999).

Für eine Reihe von probiotischen Milchsäurebakterien konnte gezeigt werden, dass sie die durch enteropathogene Bakterien induzierte Zerstörung der Tight junctions verhindern, so z. B. für die Stämme *Streptococcus thermophilus* ATCC19258, *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356 oder *Lactobacillus sobrius* DSM 16698. Dabei verstärken die Probiotika die Bildung von Tight junctions-Proteinen und verhindern gleichzeitig die Destabilisierung der Proteinkomplexe (Resta-Lenert und Barrett, 2003; Roselli et al., 2007).

Für EcN wurde ebenfalls eine stabilisierende Wirkung auf die Barrierefunktion von intestinalen Epithelzellen nachgewiesen. Bei humanen T-84-Zellen hatte der Stamm allein keinen Einfluss auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (TEER), ein Maß für die Permeabilität der Membran. Seine Koinkubation führte jedoch dazu, dass die normalerweise durch die Infektion mit *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Dublin oder EPEC induzierte Verringerung des TEER verhindert bzw. im Fall von EPEC auch rückgängig gemacht und damit die Barrierefunktion der Zellmembran erhalten bzw. wieder hergestellt wurde (Otte und Podolsky, 2004; Zyrek et al., 2007). Zurückgeführt wird dieser Effekt auf die verstärkte Expression des Proteins ZO-2 und die verringerte Umlagerung der Proteinkinase C ζ (PKC ζ) in die Zellmembran. PKC ζ liegt in nicht infizierten Zellen v. a. im Zytosol vor. In mit EPEC

infizierten Zellen scheint PKC ζ nach Umlagerung in die Membran an der Relokalisation von ZO-2 und dem Abbau der Tight junctions-Komplexe beteiligt zu sein. Eine verstärkte Expression von ZO-2 und die verringerte Aktivität von PKC ζ durch Koinkubation von EcN können somit die Integrität der Tight junctions und der Zellmembran erhöhen (Zyrek et al., 2007).

In vivo zeigten Ukena et al. (2007), dass die orale Applikation von EcN Mäuse vor einer mit Dextrannatriumsulfat (DSS) künstlich induzierten Kolitis schützt. Die Autoren führten diesen Effekt auf die Stabilisierung der Membranintegrität durch eine verstärkte Bildung von ZO-1 und eine verringerte Permeabilität zurück. Schroeder et al. (2006) konnten zudem nachweisen, dass EcN im Schwein die durch ETEC oder Forskolin induzierte verstärkte sekretorische Aktivität des Epithels unterbindet. Weitere in vivo-Studien belegen, dass EcN effektiv Durchfallsymptome reduziert (Henker et al., 2007; Tromm et al., 2004; von Buenau et al., 2005). Es ist zu vermuten, dass die membranstabilisierende Wirkung von EcN in vivo effektiv zum probiotischen Charakter des Stammes beiträgt.

Diese Ergebnisse lassen keinen Rückschluss darauf zu, inwieweit die Stabilisierung der Membranintegrität in vitro die Infektion pathogener Bakterien reduzieren kann. Die angeführten Untersuchungen von Otte & Podolsky (2004) und Zyrek et al. (2007) berücksichtigten nicht die Wirkung von EcN auf die Adhäsion bzw. Invasion der Pathogene. In der vorliegenden Arbeit konnte weder durch Ko- noch durch Nachinkubation die Adhäsion von aEPEC gehemmt werden. Ein möglicher stabilisierender Effekt von EcN auf die Membranstabilität in IPEC-J2 würde demnach die Infektion in vitro nicht beeinflussen. Diese Annahme wird unterstützt durch Untersuchungen von McNamara et al. (2001), die zeigten, dass die Zerstörung der Membranintegrität durch EPEC in vitro nicht Voraussetzung für die Adhäsion des Pathogens und die Ausbildung von A/E-Läsionen ist oder dazu beiträgt. Darüber hinaus zeigten Otte & Podolski (2004), dass zur Erhöhung der Membranintegrität der direkte Kontakt der Bakterien von EcN mit den Epithelzellen nötig ist, dessen Kulturüberstände hingegen keine Wirkung haben. Da aber in der vorliegenden Arbeit auch Kulturüberstände von EcN den inhibierenden Effekt auf die aEPEC-Infektion vermittelten, kann eine mögliche Erhöhung der Membranintegrität durch EcN als Ursache für die Inhibierung der aEPEC-Infektion in vitro ausgeschlossen werden.

Muzine

Eine Rolle bei der Hemmung der aEPEC-Infektion könnten ebenso von den Epithelzellen gebildete Muzine spielen. Mack et al. (1999) zeigten, dass die probiotischen *Lactobacillus*-Stämme *L. plantarum* 299v und *L. rhamnosus* GG nach Adhäsion an der humanen intestinalen Epithelzelllinie HT-24 die Bildung des sezernierten Muzins MUC2 und des membrangebundenen Muzins MUC3 erhöhten und gleichzeitig die Adhäsion des humanen

EPEC-Stammes E2348/69 hemmten. Den gleichen Effekt auf die MUC3-Bildung in HT-29-Zellen hatte das Serum-Amyloid A3 (SAA3). Auch hier konnte ein inhibierender Effekt auf die Adhäsion von EPEC-Stämmen nachgewiesen werden (Larson et al., 2003). Der zugrunde liegende Mechanismus wurde bisher nicht identifiziert. MUC2 und MUC3 reduzierten die Adhäsion von EPEC-Stämmen auch, wenn sie im Medium in löslicher Form vorlagen. Es wird deshalb angenommen, dass die Bakterien an Muzine binden (Mack et al., 1999). Die meist O-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidketten der Muzine dienen einer Vielzahl von Bakterien als Rezeptorstrukturen (Liévin-Le Moal und Servin, 2006). Eine Sezernierung der Muzine könnte dazu führen, dass bakterielle Adhäsine geblockt werden und bei Kontakt mit den Epithelzellen nicht mehr an Oberflächenrezeptoren binden können. Diese These setzt voraus, dass auch das membrangebundene Mucin MUC3 von HT-24-Zellen sezerniert werden kann. Mack et al. (2003) konnten tatsächlich erhöhte Gehalte von gelöstem MUC3 im Zellkulturüberstand von HT-24-Zellen nach Adhäsion der probiotischen *Lactobacillus*-Stämme nachweisen.

Das Mucin MUC2 wird im Darm ausschließlich von Becherzellen sezerniert, während das membrangebundene Mucin MUC3 sowohl von Becherzellen als auch von Enterozyten gebildet werden kann (Chang et al., 1994). Die Sezernierung von MUC2 und MUC3 durch HT-24-Zellen ist darauf zurückzuführen, dass diese Enterozyten bei Anzucht in glukosefreiem und galaktosehaltigem Medium teilweise zu Becherzellen differenzieren (Huet et al., 1987). Die Zelllinie IPEC-J2 zeigt bei Standardkultivierung in glukosehaltigem Medium keine Differenzierung der Enterozyten und bildet kein MUC2, aber mit großer Wahrscheinlichkeit MUC3 (Schierack et al., 2006).

Otte & Podolsky (2004) zeigten, dass EcN im Gegensatz zu verschiedenen Milchsäurebakterien die Bildung von Muzinen (MUC1, MUC2, MUC3, MUC5AC) in HT-29-Zellen nicht signifikant erhöht. EcN könnte einen ähnlichen Effekt auf IPEC-J2-Zellen ausüben. Da aber in der vorliegenden Arbeit die Mucin-Bildung in IPEC-J2 nicht überprüft wurde, kann eine Induzierung der Mucinproduktion und ein möglicher inhibierender Effekt auf die aEPEC-Infektion nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Defensine

Wehkamp et al. (2004) zeigten, dass EcN in den humanen Epithelzelllinien CaCo-2, T-84 und HT-29 die Bildung von β -Defensin-2 (hBD-2) induziert. Defensine spielen eine wesentliche Rolle bei der unspezifischen Abwehr von Pathogenen. Sie können eine antibakterielle Aktivität gegenüber Bakterien, Protozoen, Viren und Pilzen aufweisen und als Mediatoren von adaptiven Immunreaktionen agieren (Liévin-Le Moal und Servin, 2006). Die verstärkte Bildung von hBD-2 in intestinalen Epithelzellen könnte deshalb ein Wirkungsmechanismus von EcN zur Reduktion von enteropathogenen Bakterien im Darm

darstellen. Die Bildung von β -Defensinen (pBD-1, pBD-2) wurde auch in porcinen intestinalen Epithelzellen (IPI-2I) sowie im Schweinedarm nachgewiesen (Veldhuizen et al., 2006; Veldhuizen et al., 2007). Das Defensin pBD-2 zeigt dabei unter anderem eine hohe antibakterielle Aktivität gegen Enteropathogene wie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium und *Listeria monocytogenes* (Veldhuizen et al., 2008).

Es ist denkbar, dass EcN auch die Bildung von pBD-2 in IPEC-J2-Zellen induziert und diese durch Abtötung von aEPEC-Bakterien zur Verringerung der Infektion beitragen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein verringertes Wachstum von aEPEC im Kulturüberstand beobachtet. Es bleibt zu überprüfen, ob pBD-2 von IPEC-J2-Zellen gebildet wird und eine antibakterielle Wirkung gegenüber aEPEC aufweist. Eine mögliche Wirkung von β -Defensinen gegenüber aEPEC kann jedoch nicht Hauptursache des inhibierenden Effektes von EcN auf die aEPEC-Infektion sein. Schlee et al. (2007) zeigten, dass die durch EcN induzierte Bildung von hBD-2 in CaCo-2-Zellen durch Flagellin vermittelt wird. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass eine flagellenlose Mutante des Stammes EcN (EcN $\Delta fliA$) ebenfalls die aEPEC-Infektion inhibiert.

5.3.4 Einfluss von EcN auf die Sezernierung virulenzassoziierter Proteine durch EPEC

Die Infektion von Darmepithelzellen durch EPEC, deren Adhäsion und die Ausbildung von A/E-Läsionen sowie weiterer charakteristischer histopathologischer Veränderungen werden durch eine Vielzahl von virulenzassozierten Proteinen vermittelt, die über ein Typ 3-Sekretionssystem (T3SS) entweder zur Wirtszelloberfläche hin oder aber als sogenannte Effektorproteine direkt in das Zytosol der Wirtszelle transloziert werden. Eine verringerte Sezernierung dieser Proteine resultiert in einer verringerten Virulenz von EPEC und reduziert dessen Infektionsrate (Jarvis et al., 1995; Nataro und Kaper, 1998). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb überprüft werden, ob EcN einen Einfluss auf die Sezernierung virulenzassoziierter Proteine durch EPEC hat und über diesen Weg die Adhäsion des Pathogens inhibiert. Es zeigte sich, dass der porcine aEPEC-Stamm P2005/03 nur sehr geringe Mengen an Proteinen sezernierte, die für eine Analyse nicht ausreichten. Deshalb wurde mit dem humanen typischen EPEC-Stamm E2348/69 gearbeitet. E2348/69 scheidet in DMEM/HAM'S auch ohne Kontakt zu Epithelzellen Proteine aus (Deng et al., 2005). Die starke Sezernierung von Proteinen durch E2348/69 ist auf das Vorhandensein des EAF-Plasmids und dem darauf kodierten Regulatoroperon *perABC* (*Plasmid encoded regulator*) zurückzuführen. *PerA* reguliert die Transkription der LEE-Gene durch direkte Aktivierung des LEE-kodierten Regulatorgens *ler*. *PerB* und *perC* verstärken die Aktivität von *perA* (Gómez-Duarte und Kaper, 1995; Mellies et al., 1999). Die Regulation durch *perABC* trägt wesentlich

zur vollen Virulenz von EPEC-Stämmen bei. Knutton et al. (1998) wiesen darauf hin, dass EAF-negative EPEC-Stämme deutlich geringere Mengen an Proteinen ausscheiden und in ihrer Virulenz reduziert sind. Der Unterschied zwischen typischen und atypischen EPEC-Stämmen hinsichtlich der Infektionsstärke konnte auch in der vorliegenden Arbeit für die Stämme E2348/69 und P2005/03 beobachtet werden.

Es zeigte sich, dass EcN bei Vorinkubation die Infektion von IPEC-J2 mit E2348/69 in gleichem Maße reduzierte wie die Infektion mit P2005/03. Die inhibierende Wirkung von EcN beschränkt sich demnach nicht nur auf atypische porcine EPEC-Stämme.

Die Sezernierung von Proteinen durch E2348/69 wurde in Kulturüberständen von EcN (OD_{600} 1,0) fast vollständig inhibiert. Dies gilt sowohl für die spezifisch nachgewiesenen Proteine EspA, EspB und Tir als auch für alle anderen Proteine. Der Effekt war nicht spezifisch für EcN, wenngleich deutlich schwächer ausgeprägt für MG1655. Er wurde außerdem durch Verdünnung der Überstände aufgehoben, was wie bei der Vorinkubation von EcN-Bakterien auf eine dosisabhängige Wirkung schließen lässt.

Die Tatsache, dass durch die unverdünnten Kulturüberstände von EcN die Sezernierung aller Proteine von EPEC gleichermaßen gehemmt wurde, deutet darauf hin, dass entweder das T3SS oder aber die Expression der LEE-Gene, die für die meisten der sezernierten Proteine sowie für das T3SS kodieren, inhibiert sein könnten. Das T3SS wird von einer Vielzahl anderer gramnegativer pathogener Bakterien wie beispielsweise EHEC, *Yersinia* sp., *Shigella* sp., *Salmonella* sp. oder *Chlamydia* sp. zur Translokation virulenzassoziiierter Effektorproteine in die Wirtszelle verwendet. Es weist eine sehr konservierte Organisation und Zusammensetzung auf und ist essentiell für die Virulenz der Bakterien (Hueck, 1998). Seine Hemmung stellt damit einen effektiven Mechanismus bei der Bekämpfung nicht nur von EPEC, sondern auch vieler anderer enteropathogener Bakterien dar. Es wurde nachgewiesen, dass einige niedermolekulare organische Verbindungen das T3SS inhibieren können wie beispielsweise azetylierte Hydrazone verschiedener Salicylaldehyde bei *Yersinia* sp. und *Chlamydia* sp. (Nordfelth et al., 2005; Wolf et al., 2006). Es liegen bisher aber keine Erkenntnisse dazu vor, ob Probiotika direkt das T3SS blockieren können. In der vorliegenden Arbeit konnte in den EPEC-Bakterien selbst nur eine leichte Reduzierung an EspA, EspB und Tir nachgewiesen werden. Möglicherweise weist das auf eine Inhibierung des T3SS hin. Bessere Aufklärung könnten hier Genexpressionstudien von entsprechend für das T3SS kodierenden Genen sowie weiteren virulenzassoziierten Genen liefern.

Die Regulation der Virulenzgenexpression in EPEC erfolgt als Antwort auf Stimuli der Umgebung wie Temperatur, pH-Wert, Osmolarität und Wachstumsphase (Kenny et al., 1997; Sperandio et al., 1999; Umanski et al., 2002). Eine wichtige Rolle spielt dabei der LEE-kodierte Regulator Ler, der die Transkription der LEE-kodierten Gene und weiterer, außerhalb des LEE kodierter Virulenzgene kontrolliert (Elliott et al., 2000). Daneben

interagiert eine Reihe globaler Regulatoren des bakteriellen Metabolismus direkt oder indirekt mit Ler und beeinflussen so die Expression der Virulenzgene. Zu nennen sind hier v. a. Fis, IHF, QseA und AI-2 als Aktivatoren für Ler und H-NS und Hha, welche als Repressoren für Ler agieren (Bustamante et al., 2001; Friedberg et al., 1999; Goldberg et al., 2001; Sharma und Zuerner, 2004; Sperandio et al., 2002; Sperandio et al., 1999).

Medellin-Pena et al. (2007) zeigten, dass der Überstand des probiotischen *Lactobacillus acidophilus*-Stammes La-5 signifikant die Konzentration des Homoserinlaktons AI-2, ein *Quorum sensing*-Signalmolekül, und die Expression virulenzassoziiierter Gene in EHEC (O157:H7) reduziert. Ein möglicher Einfluss des pH-Wertes durch Ausscheidung von Milchsäure wurde dabei nicht untersucht. Valdez et al. (2005) konnten für *Lactobacillus plantarum* einen ähnlichen Effekt auf die Bildung von Homoserinlaktonen durch *Pseudomonas aeruginosa* nachweisen. Die Autoren belegten, dass die Inhibierung des *Quorum sensing*-Signals nur zum Teil auf eine Azidifizierung des Überstandes zurückzuführen ist. Bei EPEC bewirkt eine Absenkung des pH-Wertes eine Inhibierung der Proteinsekretion (Kenny et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit ist sie jedoch nur zu einem geringen Teil Ursache der Hemmung, da die Korrektur des pH-Wertes mit geringfügiger Abweichung die Proteinsekretion ebenfalls drastisch hemmt.

Obgleich auch durch andere Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass *E. coli*-Überstände die Sekretion von virulenzassoziierten Proteinen in EHEC inhibieren können (Kanamaru et al., 2000), liegen bisher keine Erkenntnisse dazu vor, welche Regulatoren dabei beeinflusst werden. Die von Kanamaru et al. (2000) vermutete Beteiligung des *Quorum sensing*-Systems ist bisher nicht eindeutig belegt. Die Tatsache, dass sowohl pathogene EHEC als auch nicht pathogene *E. coli*-K-12-Stämme in Abhängigkeit ihrer Zelldichte die Sekretion von Proteinen durch EHEC inhibierten, unterstützt aber diese interessante These und ließe auf einen allgemeinen Regulationsmechanismus in *E. coli* und eine mögliche Anreicherung eines Faktors schließen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen hierzu Parallelen.

EcN wirkt in vitro gegen eine Vielzahl von enteropathogenen Bakterien, die verschiedene Infektionsstrategien verfolgen: (1) extrazelluläre adhärente EPEC, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, (2) invasive AIEC (Boudeau et al., 2003), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium und *Shigella flexneri*, die über einen der Makropinozytose ähnlichen Prozess in die Wirtszelle invasieren oder (3) *Yersinia enterocolitica* und *Listeria monocytogenes*, deren Internalisation über einen reißverschlussähnlichen Prozess erfolgt (Altenhoefer et al., 2004; Cossart et al., 2000). Sie alle verfügen über diverse Mechanismen, um an Wirtszellen zu adhären und diese zu kolonisieren. Diese spezifisch zu blockieren erscheint unmöglich. Zu vermuten ist vielmehr, dass EcN in einen Virulenzmechanismus eingreift, der den genannten Pathogenen gemein ist. Die Inhibierung der Expression von

Virulenzgenen über eine Interaktion mit globalen Regulationsmechanismen würde solch einen effektiven Mechanismus darstellen. Viele der für EPEC genannten globalen Regulatoren kommen auch in anderen gramnegativen enteropathogenen Bakterien vor und kontrollieren die Transkription virulenzassoziierter Gene. So agiert beispielsweise H-NS als Repressor für die virulenzgenregulierenden Proteine HilA in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium (Schechter et al., 2003), VirB in *Shigella flexneri* (Tobe et al., 1993) oder RovA in *Yersinia pseudotuberculosis* (Tran et al., 2005). Homoserinlaktone wie AI-2 werden ebenfalls von einer Vielzahl von Bakterien zur Aktivierung der Virulenzgene genutzt und ermöglichen die inner- und zwischenartliche Kommunikation (*Quorum sensing*) (Kaper und Sperandio, 2005).

Die vorliegende Arbeit belegt, dass EcN bei vorheriger Applikation in vitro porcine Epithelzellen effektiv gegen die Infektion mit aEPEC schützen kann. Als aktive Komponente wurde ein in den Überstand abgegebener Faktor beschrieben, der nicht spezifisch für EcN zu sein scheint. Obwohl dieser Faktor nicht identifiziert wurde, konnten einige mögliche, für EcN in der Literatur diskutierte Wirkungsmechanismen wie kompetitive Exklusion, antibakterielle Wirkung von Mikrozininen oder Defensinen, Stärkung der Barriere- und Abwehrfunktion der Wirtszelle im verwendeten in vitro-Modell als Ursache für die Hemmung von aEPEC als geringfügig eingestuft oder ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben erstmals einen konkreten Hinweis auf einen möglicherweise gegen viele enteropathogene Bakterien gerichteten Wirkungsmechanismus von EcN, die Inhibierung der Virulenzgenexpression. Weitere Untersuchungen sind nötig, um diese These zu bestätigen. Im Mittelpunkt zukünftiger Studien könnte zudem die Fraktionierung der Überstände und die Isolierung und Identifizierung des inhibierenden Faktors stehen. Das in dieser Arbeit verwendete Infektionsmodell mit der porcinen intestinalen Epithelzelllinie IPEC-J2 und EPEC erwies sich hierbei als ausgezeichnetes Testsystem zur Wirkung des Inhibitors. Die Identifizierung des Inhibitors sollte wesentlich zur Aufklärung seiner möglichen Wirkorte beitragen.

5.4 Abhängigkeit des inhibierenden Effektes von der zeitlichen Applikation von EcN im IPEC-J2-Modell

Der inhibierende Einfluss von EcN auf enteroinvasive Bakterien wurde nicht nur bei Vorinkubation, sondern auch bei Koinkubation des Stammes in vitro beschrieben (Altenhoefer et al., 2004; Boudeau et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit war der inhibierende Effekt von EcN auf die aEPEC-Infektion jedoch zwingend von der vorherigen Applikation von EcN abhängig. Wie in Kapitel 5.1 gezeigt, ist der inhibierende Effekt von EcN

auf die aEPEC-Infektion auf die Abgabe eines Faktors in den Kulturüberstand zurückzuführen. Dieser Faktor wirkt in Abhängigkeit von seiner Konzentration und damit von der eingesetzten Dosis von EcN. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass sich EcN auf den Epithelzellen und im Zellkulturmedium vermehrt, die Konzentration des inhibierenden Faktors also mit der Zeit zunimmt. Durch den Einsatz von Kulturüberständen wurde gezeigt, dass EcN diesen Faktor auch ohne Kontakt zu den Epithelzellen in den Kulturüberstand abgibt. Die Adhäsion von EcN sollte jedoch wesentlich dazu beitragen, den Faktor direkt auf der Epithelzelloberfläche zu präsentieren und zu konzentrieren. Je später die Applikation von EcN, desto geringer die Adhäsion von EcN und die Konzentration des inhibierenden Faktors auf der Zelloberfläche. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass durch den inhibierenden Faktor die initiale Anheftung von aEPEC unterbunden wird. Seine Wirkung hängt demzufolge auch wesentlich davon ab, inwieweit sich die aEPEC-Bakterien bereits auf den Epithelzellen etabliert haben. Auch hier gilt: je später die Applikation, desto geringer der inhibierende Effekt auf die aEPEC-Infektion.

Diese Annahmen erklären, warum bei Ko- und Nachinkubation von EcN keine drastische Reduktion der aEPEC-Infektion wie bei der Vorinkubation beobachtet werden konnte. Dennoch, ein inhibierender Einfluss von EcN zeigte sich auch bei Ko- und Nachinkubation von EcN beim Wachstum der Mikrokolonien, wenngleich in sehr viel geringerem Ausmaß als bei der Vorinkubation. Bei der Nachinkubation von EcN war der Effekt geringer als bei der Koinkubation. Diese Abstufung unterstützt die Annahme, dass der inhibierende Effekt von der Konzentration und der zeitlichen Applikation abhängt.

Entgegen den Erwartungen zeigte sich jedoch auch, dass Ko- und Nachinkubation von EcN die Adhäsionsrate von aEPEC erhöhten. Dieser Effekt nahm zu, je später EcN appliziert wurde. Es wird angenommen, dass ein weiterer Faktor von EcN die Adhäsion von aEPEC stimuliert. Dieser kommt erst zum Tragen, wenn der inhibierende Faktor aufgrund einer zu geringen Konzentration oder einem späten zeitlichen Vorhandensein unzureichend wirkt und aEPEC-Bakterien auf der Epithelzelloberfläche adhärieren können. Dieser auf die Infektionsrate stimulierende Effekt von EcN wurde bisher in der Literatur bei keinem anderen Bakterium beschrieben.

Ein erhöhtes Wachstum von aEPEC im Kulturüberstand bei Ko- und Nachinkubation von EcN kann als Hauptursache für eine erhöhte Adhäsionsrate ausgeschlossen werden, da diese nur geringfügig ist.

Anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass sich der Stamm EcN nach Adhäsion an IPEC-J2 mit Hilfe von H1-Flagellen vernetzt und dadurch wesentlich seine Adhäsion erhöht (siehe Kapitel 5.2). Diese Flagellen umspannen auch adhärente aEPEC-Bakterien und könnten bei Ko- und Nachinkubation die Bindung von aEPEC an IPEC-J2 festigen und deren Infektionsrate erhöhen. Durch den Einsatz der

Flagellen-Mutante von EcN (EcN $\Delta fliA$) in Nachinkubationsexperimenten konnte diese These jedoch widerlegt werden. Die Deletion der H1-Flagellen in EcN resultierte ebenfalls in einer erhöhten Infektionsrate. Vielmehr deuten Nachinkubationsversuche mit den EcN-Mutanten für Typ 1- (EcN Δfim) und F1C-Fimbrien (EcN Δfoc , EcN $\Delta focfim$) darauf hin, dass möglicherweise die F1C-Fimbrien, welche die sehr gute Adhäsionsfähigkeit von EcN und den inhibierenden Effekt von EcN bei Vorinkubation vermitteln, gleichzeitig die Adhäsion des aEPEC-Stammes stimulieren. Die Nachinkubation von EcN Δfoc und EcN $\Delta focfim$ reduzierte die aEPEC-Infektion geringfügig, die Nachinkubation von EcN Δfim führte hingegen unverändert zu einer Stimulation.

Wie in Kapitel 5.3.2 diskutiert, könnten EcN und aEPEC z. B. mit den Glykospingolipiden durchaus gleiche Rezeptorstrukturen zur Adhäsion nutzen (Bäckhed et al., 2002; Jagannatha et al., 1991; Khan et al., 2000). Es ist möglich, dass EcN die Bildung und/oder Verteilung dieser oder weiterer, ebenfalls durch aEPEC genutzter Oberflächenrezeptoren induziert. Lyczak (2003) beschrieb beispielsweise eine Erhöhung der Adhäsion und Invasion von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Thyphi in vitro in T84-Zellen und MDCK-Zellen sowie in vivo in C57BL/6-Mäusen durch einen kommensalen *Enterococcus faecalis*-Stamm. Der Autor führte diesen Effekt auf die durch *Enterococcus faecalis* induzierte Umverteilung des CFTR-Rezeptors (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) zurück, der von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Thyphi zur Adhäsion genutzt wird.

Für eine mögliche Stimulierung von Oberflächenrezeptoren für aEPEC spricht auch die Tatsache, dass der typische EPEC-Stamm E2348/69 in der vorliegenden Arbeit durch die Nachinkubation von EcN nicht in seiner Infektion beeinflusst wurde. Typische EPEC-Stämme nutzen für die initiale Adhäsion anders als aEPEC neben EspA in erster Linie *Bundle Forming Pili* (BFP) (Cleary et al., 2004), die dementsprechend mit anderen Oberflächenrezeptoren interagieren könnten.

5.5 Wirkung des probiotischen *E. faecium*-Stammes SF68 auf die aEPEC-Infektion im IPEC-J2-Modell

Die vorliegende Arbeit war Bestandteil des DFG-Projektes FOR 438 „Integrative Analyse der Wirkungsmechanismen von Probiotika beim Schwein“ am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin. Darin wurde in einem interdisziplinären Ansatz u. a. der Einfluss des probiotischen *Enterococcus faecium*-Stammes SF68 (NCIMB 10415) auf Leistungsparameter und Gesundheit von Ferkeln, im Besonderen auf die intestinale Mikrobiota sowie auf die Morphologie, Physiologie und Immunologie des Darmes untersucht (1.4.2). Ergänzend zu diesen wichtigen in vivo-Daten wurde in in vitro-Modellen überprüft, ob der Stamm einen Einfluss auf bestimmte intestinale Pathogene hat. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit wurde dabei wie für EcN die Wirkung auf die Infektion von IPEC-J2-Zellen mit aEPEC untersucht, denn nach bisherigem Forschungsstand liegen weder in vivo- noch in vitro-Erkenntnisse dazu vor. Von besonderem Interesse war zudem, inwieweit sich die Stämme EcN und *E. faecium* SF68 in ihrer Wirkung unterscheiden. Ihre Zugehörigkeit zu ganz unterschiedlichen Bakterienordnungen (*Enterobacteriales* bzw. *Lactobacillales*) und die daraus resultierenden genetischen und physiologischen Unterschiede lassen unterschiedliche Wirkungsmechanismen vermuten.

E. faecium ist Bestandteil der indigenen Mikrobiota und die dominierende *Enterococcus*-Art im Schwein (Devriese et al., 1994). Der Stamm SF68 wird sowohl als Probiotikum beim Menschen als auch als Futterzusatzstoff beim Tier eingesetzt. Studien hinsichtlich seiner Wirkung gegenüber Durchfallerkrankungen lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Während beispielsweise Wunderlich et al. (1989) eine kurative Wirkung des Stammes gegenüber akuter Diarrhö beim Menschen beschrieben, konnten Canani et al. (2007) und Mitra & Rabbani (1990) dies nicht bestätigen. Untersuchungen beim Schwein deuten aber auf eine mögliche präventive Wirkung gegenüber Durchfallerkrankungen bei Ferkeln hin. Zeyner & Boldt (2006) zeigten, dass die kontinuierliche Fütterung des Stammes SF68 von der Geburt bis zum Absetzen der Ferkel die Durchfallhäufigkeit verringern kann, die nachträgliche Gabe aber zu keiner Verbesserung der Symptome bei bereits vorhandenem Durchfall führt. Die Ergebnisse der DFG-Forschergruppe 438 deuten ebenfalls auf präventive Effekte des Stammes hin. Hier wurde der Stamm bereits an die Muttersauen während der Trächtigkeit gefüttert. Die Ferkel nahmen das Probiotikum über den Kot der Sau auf und wurden ab dem 14. Lebenstag ebenfalls zugefüttert. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Durchfallhäufigkeit (Taras et al., 2006) als auch die Anzahl hämolysierender *E. coli* und *E. coli* des Serotyps O141 im Kot der Ferkel abnahmen (Scharek et al., 2005). *E. coli*-Stämme des Serotyps O141 sind häufig assoziiert mit Durchfallerkrankungen in Absetzferkeln (Hopwood und Hampson, 2003). Die Hämolysen ist nicht zwingend mit der Pathogenität von *E. coli*-Stämmen verbunden (Schierack et al., 2006), doch sie ist oftmals ein Charakteristikum von Durchfall verursachenden *E. coli*-Stämmen in Ferkeln (Hopwood und Hampson, 2003). Im Hinblick auf die reduzierten Durchfallraten könnte der Stamm SF68 deshalb durchaus zur Hemmung pathogener *E. coli* im Darm beigetragen.

Ein möglicher Wirkungsmechanismus von *E. faecium* wurde von Jin et al. (2000) diskutiert. Die Autoren wiesen für den nicht pathogenen *E. faecium*-Stamm 18C23 nach, dass die Koinkubation der Bakterien und ihres Kulturüberstandes die Adhäsion von ETEC an Mukus, welcher aus dem Dünndarm von Ferkeln isoliert wurde, inhibiert. Als Ursachen wurden hierbei die sterische Blockierung von Adhäsionsrezeptoren und die Azidifizierung des Kulturmediums diskutiert.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass SF68 unabhängig von der zeitlichen Applikation in vitro die aEPEC-Infektion nicht hemmen kann. Die Koinkubation des Kulturüberstandes führte jedoch zu reduzierten Infektionsraten (um 40 %). Der fehlende Einfluss lebender Bakterien von SF68 könnte auf eine geringe Dosierung zurückzuführen sein. Jin et al. (2000) zeigten, dass der Effekt des Stammes 18C23 auf die Adhäsion von ETEC abhängig von der eingesetzten Dosis war. Eine starke Inhibierung konnte erst bei einer Dosis von 2×10^8 Bakterien/Loch nachgewiesen werden. Eine zu SF68 vergleichbare Dosis von 1×10^7 Bakterien/Loch zeigte hingegen nur einen geringen inhibierenden Effekt auf die Adhäsion von ETEC. Es ist daher zu prüfen, ob SF68 bei höherer Dosierung die Infektion von aEPEC-Stämmen hemmen kann.

Aufgrund der inhibierenden Wirkung des Kulturüberstandes von SF68 bei Koinkubation kann man davon ausgehen, dass der Stamm einen hemmenden Faktor in den Überstand abgibt, wie es auch schon vergleichend für EcN und die anderen in der Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme gezeigt wurde. Die Überstände wurden aus Kulturen bei OD₆₀₀ 1,0 gewonnen. Dies entspricht bei SF68 in etwa einer Anzahl von 3×10^8 Bakterien/ml Kulturüberstand. Bei Koinkubation lebender Bakterien wurde eine Inokulationsstärke von nur 1×10^7 verwendet und aufgrund eines Waschschrilles nach 3 h die Mehrzahl der Bakterien wegen ihrer geringen Adhäsion abgewaschen. Eine Konzentrierung möglicher inhibierender Faktoren im Zellkulturüberstand wurde dadurch unterbunden. Durch den Wechsel des Medium wurden zudem bis dahin abgegebene Mengen entfernt. Im Vergleich zum Einsatz von Kulturüberständen bei OD₆₀₀ 1,0, die durchgehend auf den Epithelzellen inkubiert wurden, verringerte sich dadurch erheblich die Konzentration und die Wirkungsdauer möglicher inhibierender Faktoren. Unter der Annahme einer konzentrationsabhängigen Wirkung solcher Faktoren erklärt dies, warum die Kulturüberstände nicht jedoch die lebenden Bakterien bei Koinkubation die aEPEC-Infektion hemmten.

Viele Bakterienarten der Gattung *Enterococcus* sind in der Lage, Enterocine (Bakteriozine) zu bilden, die in erster Linie gegen nah verwandte Milchsäurebakterien aber auch gegen andere grampositive Bakterienarten wie *Listeria monocytogenes* oder gramnegative *Enterobacteriaceae*-Arten wie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis oder *E. coli* wirken können (Lauková und Czikková, 1998; Theppangna et al., 2007). SF68 produziert ein ca. 4,5 kDa großes, bisher nicht identifiziertes Enterocin (Foulquié Moreno et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte im Plattenhemmtest keine bakterizide Wirkung von SF68 auf P2005/03 nachgewiesen werden, wenngleich die tatsächliche Bildung des Enterocins nicht überprüft wurde. Da zudem im Infektionstest die Viabilität bzw. das Wachstum von P2005/03 im Kulturüberstand von SF68 deutlich weniger herabgesetzt wurde als die Infektionsrate, ist die Inhibierung der aEPEC-Infektion vermutlich nicht auf die Produktion eines Enterotoxins zurückzuführen. Eine Azidifizierung als Ursache für die Inhibierung kann nicht ganz

ausgeschlossen werden. Der pH-Wert des Kulturüberstandes war aber während der Infektion nur geringfügig abgesenkt (7,5 → 7,0).

Interessanterweise wurde mit Kulturüberständen von EcN, IMT13962 und MG1655 eine doppelt so starke Inhibierung der aEPEC-Infektion erzielt wie mit Kulturüberständen von SF68. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass *E. coli* und *E. faecium* unterschiedliche Inhibitoren und/oder Wirkungsmechanismen gegenüber aEPEC-Stämmen aufweisen. Diese Fragestellung kann letztendlich aber nur durch die Identifizierung des jeweiligen inhibierenden Faktors beantwortet werden.

Literaturverzeichnis

- Adami, A. und Cavazzoni, V. (1999): Occurrence of selected bacterial groups in the faeces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic, J Basic Microbiol 39 [1], Seite 3-9.
- Ahmed, K.; Suzuki, Y.; Miyamoto, D. und Nagatake, T. (2002): Asialo-GM1 and asialo-GM2 are putative adhesion molecules for *Moraxella catarrhalis*, Med Microbiol Immunol 191 [1], Seite 5-10.
- Aktan, I.; Sprigings, K. A.; La Ragione, R. M.; Faulkner, L. M.; Paiba, G. A. und Woodward, M. J. (2004): Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales, Vet Microbiol 102 [1-2], Seite 43-53.
- Albert, M. J.; Ansaruzzaman, M.; Islam, M. M.; Haider, K.; Alam, K.; Kabir, I. und Robins-Browne, R. (1992): Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*, J Med Microbiol 37 [5], Seite 310-314.
- Allen, L. N. und Hanson, R. S. (1985): Construction of broad-host-range cosmid cloning vectors: identification of genes necessary for growth of *Methylobacterium organophilum* on methanol, J Bacteriol 161 [3], Seite 955-962.
- Altenhoefer, A.; Oswald, S.; Sonnenborn, U.; Enders, C.; Schulze, J.; Hacker, J. und Oelschlaeger, T. A. (2004): The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens, FEMS Immunol Med Microbiol 40 [3], Seite 223-229.
- Bäckhed, F.; Alsén, B.; Roche, N.; Ångström, J.; von Euler, A.; Breimer, M. E.; Westerlund-Wikström, B.; Teneberg, S. und Richter-Dahlfors, A. (2002): Identification of target tissue glycosphingolipid receptors for uropathogenic, F1C-fimbriated *Escherichia coli* and its role in mucosal inflammation, J Biol Chem 277 [20], Seite 18198-18205.
- Bäckhed, F.; Ding, H.; Wang, T.; Hooper, L. V.; Koh, G. Y.; Nagy, A.; Semenkovich, C. F. und Gordon, J. I. (2004): The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage, Proc Natl Acad Sci U S A 101 [44], Seite 15718-15723.
- Bäckhed, F.; Ley, R. E.; Sonnenburg, J. L.; Peterson, D. A. und Gordon, J. I. (2005): Host-bacterial mutualism in the human intestine, Science 307 [5717], Seite 1915-1920.
- Barba, J.; Bustamante, V. H.; Flores-Valdez, M. A.; Deng, W.; Finlay, B. B. und Puente, J. L. (2005): A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA, J Bacteriol 187 [23], Seite 7918-7930.
- Barnhart, M. M. und Chapman, M. R. (2006): Curli biogenesis and function, Annu Rev Microbiol 60, Seite 131-147.
- Batchelor, M.; Guignot, J.; Patel, A.; Cummings, N.; Cleary, J.; Knutton, S.; Holden, D. W.; Connerton, I. und Frankel, G. (2004): Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection, EMBO Rep 5 [1], Seite 104-110.
- Beaugerie, L. und Petit, J. C. (2004): Antibiotic-associated diarrhoea, Best Pract Res Clin Gastroenterol 18 [2], Seite 337-352.

- Beckmann, L.; Simon, O. und Vahjen, W. (2006): Isolation and identification of mixed linked β -glucan degrading bacteria in the intestine of broiler chickens and partial characterization of respective 1,3-1,4- β -glucanase activities, J Basic Microbiol 46 [3], Seite 175-185.
- Berg, R. D. (1996): The indigenous gastrointestinal microflora, Trends Microbiol 4 [11], Seite 430-435.
- Bertschinger, H. U. und Fairbrother, J. M. (1999): *Escherichia coli* infections, Straw, B. E.; D'Allaire, S.; Mengeling, W. L. und Taylor, D. J., Diseases of Swine, 8th. Auflage, Seite 431-468, Blackwell Science, Oxford.
- Bhavsar, A. P.; Guttman, J. A. und Finlay, B. B. (2007): Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens, Nature 449 [7164], Seite 827-834.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; Collado-Vides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B. und Shao, Y. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, Science 277 [5331], Seite 1453-1474.
- Blum-Oehler, G.; Oswald, S.; Eiteljörge, K.; Sonnenborn, U.; Schulze, J.; Kruis, W. und Hacker, J. (2003): Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples, Res Microbiol 154 [1], Seite 59-66.
- Blum, G.; Marre, R. und Hacker, J. (1995): Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6, Infection 23 [4], Seite 234-236.
- Blum, H.; Beier, H. und Gross, H.J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, Electrophoresis 8, Seite 93-99.
- Boerlin, P.; Travis, R.; Gyles, C. L.; Reid-Smith, R.; Janecko, N.; Lim, H.; Nicholson, V.; McEwen, S. A.; Friendship, R. und Archambault, M. (2005): Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario, Appl Environ Microbiol 71 [11], Seite 6753-6761.
- Boirivant, M. und Strober, W. (2007): The mechanism of action of probiotics, Curr Opin Gastroenterol 23 [6], Seite 679-692.
- Bosworth, B. T. und Casey, T. A. (1997): Identification of toxin and pilus genes in porcine *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) with multiple primer pairs., Abstracts of the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology: May 4-8 1997, Miami Beach, Florida Seite 116, American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Boudeau, J.; Barnich, N. und Darfeuille-Michaud, A. (2001): Type 1 pili-mediated adherence of *Escherichia coli* strain LF82 isolated from Crohn's disease is involved in bacterial invasion of intestinal epithelial cells, Mol Microbiol 39 [5], Seite 1272-1284.
- Boudeau, J.; Glasser, A. L.; Julien, S.; Colombel, J. F. und Darfeuille-Michaud, A. (2003): Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease, Aliment Pharmacol Ther 18 [1], Seite 45-56.
- Bradley, A. (2002): Bovine mastitis: an evolving disease, Vet J 164 [2], Seite 116-28.
- Brady, M. J.; Campellone, K. G.; Ghildiyal, M. und Leong, J. M. (2007): Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* Tir proteins trigger a common Nck-independent actin assembly pathway, Cell Microbiol 9 [9], Seite 2242-2253.

- Bryan, A.; Roesch, P.; Davis, L.; Moritz, R.; Pellett, S. und Welch, R. A. (2006): Regulation of type 1 fimbriae by unlinked FimB- and FimE-like recombinases in uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073, *Infect Immun* 74 [2], Seite 1072-1083.
- Bustamante, V. H.; Santana, F. J.; Calva, E. und Puente, J. L. (2001): Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression, *Mol Microbiol* 39 [3], Seite 664-678.
- Canani, R. B.; Cirillo, P.; Terrin, G.; Cesarano, L.; Spagnuolo, M. I.; De Vincenzo, A.; Albano, F.; Passariello, A.; De Marco, G.; Manguso, F. und Guarino, A. (2007): Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations, *BMJ* 335 [7615], Seite 340-342.
- Cantarelli, V. V.; Kodama, T.; Nijstad, N.; Abolghait, S. K.; Iida, T. und Honda, T. (2006): Cortactin is essential for F-actin assembly in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)- and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC)-induced pedestals and the α -helical region is involved in the localization of cortactin to bacterial attachment sites, *Cell Microbiol* 8 [5], Seite 769-780.
- Castellani, A. und Chalmers, A.J. (1919): *Manual of tropical medicine*, 3. ed. Auflage, Williams Wood, New York.
- Cebra, J. J. (1999): Influences of microbiota on intestinal immune system development, *Am J Clin Nutr* 69 [5], Seite 1046S-1051S.
- Chang, S. K.; Dohrman, A. F.; Basbaum, C. B.; Ho, S. B.; Tsuda, T.; Toribara, N. W.; Gum, J. R. und Kim, Y. S. (1994): Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer, *Gastroenterology* 107 [1], Seite 28-36.
- Cherrington, C. A.; Hinton, M. und Chopra, I. (1990): Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*, *J Appl Bacteriol* 68 [1], Seite 69-74.
- Chowdhury, S. R.; King, D. E.; Willing, B. P.; Band, M. R.; Beever, J. E.; Lane, A. B.; Loor, J. J.; Marini, J. C.; Rund, L. A.; Schook, L. B.; Van Kessel, A. G. und Gaskins, H. R. (2007): Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets, *BMC Genomics* 8, Seite 215, Online-Veröffentlichung.
- Clarke, S. C. (2001): Diarrhoeagenic *Escherichia coli*-an emerging problem?, *Diagn Microbiol Infect Dis* 41 [3], Seite 93-98.
- Cleary, J.; Lai, L. C.; Shaw, R. K.; Straatman-Iwanowska, A.; Donnenberg, M. S.; Frankel, G. und Knutton, S. (2004): Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin, *Microbiology* 150 [3], Seite 527-538.
- Collado, M. C.; Gueimonde, M.; Hernández, M.; Sanz, Y. und Salminen, S. (2005): Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion, *J Food Prot* 68 [12], Seite 2672-2678.
- Collado, M. C.; Meriluoto, J. und Salminen, S. (2007): Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus, *Lett Appl Microbiol* 45 [4], Seite 454-460.

- Connell, I.; Agace, W.; Klemm, P.; Schembri, M.; Mårild, S. und Svanborg, C. (1996): Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [18], Seite 9827-9832.
- Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. und Rappuoli, R. (2000): *Cellular Microbiology*, ASM Press, Washington, D.C.
- Crawford, J. A. und Kaper, J. B. (2002): The N-terminus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir mediates transport across bacterial and eukaryotic cell membranes, *Mol Microbiol* 46 [3], Seite 855-868.
- Crepin, V. F.; Prasannan, S.; Shaw, R. K.; Wilson, R. K.; Creasey, E.; Abe, C. M.; Knutton, S.; Frankel, G. und Matthews, S. (2005): Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ, *Mol Microbiol* 55 [6], Seite 1658-1670.
- Cursino, L.; Šmajš, D.; Šmarda, J.; Nardi, R. M.; Nicoli, J. R.; Chartone-Souza, E. und Nascimento, A. M. (2006): Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo, *J Appl Microbiol* 100 [4], Seite 821-829.
- Daniell, S. J.; Delahay, R. M.; Shaw, R. K.; Hartland, E. L.; Pallen, M. J.; Booy, F.; Ebel, F.; Knutton, S. und Frankel, G. (2001): Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis, *Infect Immun* 69 [6], Seite 4055-4064.
- Datsenko, K. A. und Wanner, B. L. (2000): One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 [12], Seite 6640-6645.
- Dawes, E. A.; Foster, S. M. und Dagley, S. (1953): The influence of pH value and aeration on the growth of *Aerobacter aerogenes* and *Bacterium coli* in defined media, *J Gen Microbiol* 8 [2], Seite 314-322.
- de Grado, M.; Abe, A.; Gauthier, A.; Steele-Mortimer, O.; DeVinney, R. und Finlay, B. B. (1999): Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Cell Microbiol* 1 [1], Seite 7-17.
- Dean-Nystrom, E. A. und Samuel, J. E. (1994): Age-related resistance to 987P fimbria-mediated colonization correlates with specific glycolipid receptors in intestinal mucus in swine, *Infect Immun* 62 [11], Seite 4789-4794.
- Dean, P. und Kenny, B. (2004): Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein, *Mol Microbiol* 54 [3], Seite 665-675.
- Dean, P.; Maresca, M. und Kenny, B. (2005): EPEC's weapons of mass subversion, *Curr Opin Microbiol* 8 [1], Seite 28-34.
- Deng, W.; Li, Y.; Hardwidge, P. R.; Frey, E. A.; Pfuetzner, R. A.; Lee, S.; Gruenheid, S.; Strynke, N. C.; Puente, J. L. und Finlay, B. B. (2005): Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens, *Infect Immun* 73 [4], Seite 2135-2146.
- Deng, W.; Li, Y.; Vallance, B. A. und Finlay, B. B. (2001): Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens, *Infect Immun* 69 [10], Seite 6323-6335.

- Deng, W.; Puente, J. L.; Gruenheid, S.; Li, Y.; Vallance, B. A.; Vázquez, A.; Barba, J.; Ibarra, J. A.; O'Donnell, P.; Metalnikov, P.; Ashman, K.; Lee, S.; Goode, D.; Pawson, T. und Finlay, B. B. (2004): Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [10], Seite 3597-3602.
- Devriese, L. A.; Hommez, J.; Pot, B. und Haesebrouck, F. (1994): Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs, *J Appl Bacteriol* 77 [1], Seite 31-36.
- Dixit, S. M.; Gordon, D. M.; Wu, X. Y.; Chapman, T.; Kailasapathy, K. und Chin, J. J. (2004): Diversity analysis of commensal porcine *Escherichia coli* - associations between genotypes and habitat in the porcine gastrointestinal tract, *Microbiology* 150 [6], Seite 1735-1740.
- Donnenberg, M. S. (2002): *Escherichia coli*. Virulence mechanisms of a versatile pathogen., Academic Press, San Diego, Calif.
- Donnenberg, M. S.; Girón, J. A.; Nataro, J. P. und Kaper, J. B. (1992): A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence, *Mol Microbiol* 6 [22], Seite 3427-3437.
- Donnenberg, M. S.; Kaper, J. B. und Finlay, B. B. (1997): Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells, *Trends Microbiol* 5 [3], Seite 109-114.
- Donnenberg, M. S. und Whittam, T. S. (2001): Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *J Clin Invest* 107 [5], Seite 539-548.
- Duncker, S. C.; Lorentz, A.; Schroeder, B.; Breves, G. und Bischoff, S. C. (2006): Effect of orally administered probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 on intestinal mucosal immune cells of healthy young pigs, *Vet Immunol Immunopathol* 111 [3-4], Seite 239-250.
- Duquesne, S.; Destoumieux-Garzón, D.; Peduzzi, J. und Rebuffat, S. (2007): Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria, *Nat Prod Rep* 24 [4], Seite 708-734.
- Ebel, F.; Podzadel, T.; Rohde, M.; Kresse, A. U.; Krämer, S.; Deibel, C.; Guzmán, C. A. und Chakraborty, T. (1998): Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages, *Mol Microbiol* 30 [1], Seite 147-161.
- Eckburg, P. B.; Bik, E. M.; Bernstein, C. N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M.; Gill, S. R.; Nelson, K. E. und Relman, D. A. (2005): Diversity of the human intestinal microbial flora, *Science* 308 [5728], Seite 1635-1638.
- Elliott, S. J.; Hutcheson, S. W.; Dubois, M. S.; Mellies, J. L.; Wainwright, L. A.; Batchelor, M.; Frankel, G.; Knutton, S. und Kaper, J. B. (1999): Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*, *Mol Microbiol* 33 [6], Seite 1176-1189.
- Elliott, S. J. und Kaper, J. B. (1997): Role of type 1 fimbriae in EPEC infections, *Microb Pathog* 23 [2], Seite 113-118.
- Elliott, S. J.; Sperandio, V.; Girón, J. A.; Shin, S.; Mellies, J. L.; Wainwright, L.; Hutcheson, S. W.; McDaniel, T. K. und Kaper, J. B. (2000): The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in

- enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Infect Immun 68 [11], Seite 6115-6126.
- Elliott, S. J.; Wainwright, L. A.; McDaniel, T. K.; Jarvis, K. G.; Deng, Y. K.; Lai, L. C.; McNamara, B. P.; Donnenberg, M. S. und Kaper, J. B. (1998): The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69, Mol Microbiol 28 [1], Seite 1-4.
- Erickson, K. L. und Hubbard, N. E. (2000): Probiotic immunomodulation in health and disease, J Nutr 130 [2], Seite 403S-409S.
- Escherich, T. (1885): Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings, Fort Med 3 [16], Seite 515-522.
- Ewers, C.; Janßen, T. und Wieler, L. H. (2003): Aviäre pathogene *Escherichia coli* (APEC), Berl Münch Tierärztl Wochenschr 116 [9-10], Seite 381-395.
- Ewers, C.; Li, G.; Wilking, H.; Kießling, S.; Alt, K.; Antão, E. M.; Laturmus, C.; Diehl, I.; Glodde, S.; Homeier, T.; Böhnke, U.; Steinrück, H.; Philipp, H. C. und Wieler, L. H. (2007): Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?, Int J Med Microbiol 297 [3], Seite 163-176.
- Fairbrother, J. M. und Gyles, C. L. (2006): *Escherichia coli* infections, Straw, B. E.; Zimmermann, J. J.; D'Allaire, S. und Taylor, D. J., Diseases of swine Seite 639-674, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Finlay, B. B. und Caparon, M. (2000): Bacterial adherence to cell surfaces and extracellular matrix, Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. und Rappuoli, R., Cellular microbiology Seite 67-80, ASM Press, Washington, D.C.
- Foulquié Moreno, M. R.; Callewaert, R.; Devreese, B.; Van Beeumen, J. und De Vuyst, L. (2003): Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources, J Appl Microbiol 94 [2], Seite 214-229.
- Franke, J.; Franke, S.; Schmidt, H.; Schwarzkopf, A.; Wieler, L. H.; Baljer, G.; Beutin, L. und Karch, H. (1994): Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids, J Clin Microbiol 32 [10], Seite 2460-2463.
- Frankel, G.; Lider, O.; HersHKoviz, R.; Mould, A. P.; Kachalsky, S. G.; Candy, D. C.; Cahalon, L.; Humphries, M. J. und Dougan, G. (1996): The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to β_1 integrins, J Biol Chem 271 [34], Seite 20359-20364.
- Freter, R. und Ozawa, A. (1963): Explanation for Limitation of Populations of *Escherichia Coli* in Broth Cultures, J Bacteriol 86 [5], Seite 904-910.
- Friedberg, D.; Umanski, T.; Fang, Y. und Rosenshine, I. (1999): Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*, Mol Microbiol 34 [5], Seite 941-952.
- Fujiwara, S.; Hashiba, H.; Hirota, T. und Forstner, J. F. (1997): Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliosylceramide, Appl Environ Microbiol 63 [2], Seite 506-512.

- Fujiwara, S.; Hashiba, H.; Hirota, T. und Forstner, J. F. (1999): Purification and characterization of a novel protein produced by *Bifidobacterium longum* SBT2928 that inhibits the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 (CFA/II) to gangliosylceramide, J Appl Microbiol 86 [4], Seite 615-621.
- Fujiwara, S.; Hashiba, H.; Hirota, T. und Forstner, J. F. (2001): Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor gangliosylceramide on the cell surface, Int J Food Microbiol 67 [1-2], Seite 97-106.
- Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals, J Appl Bacteriol 66 [5], Seite 365-378.
- Garmendia, J.; Frankel, G. und Crepin, V. F. (2005): Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation, Infect Immun 73 [5], Seite 2573-2585.
- Garmendia, J.; Phillips, A. D.; Carlier, M. F.; Chong, Y.; Schüller, S.; Marches, O.; Dahan, S.; Oswald, E.; Shaw, R. K.; Knutton, S. und Frankel, G. (2004): TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton, Cell Microbiol 6 [12], Seite 1167-1183.
- Garrry, G.M. (2005): Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2: The Proteobacteria 2, Springer, New York.
- Gärtner, J. F. und Schmidt, M. A. (2004): Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*, Infect Immun 72 [11], Seite 6722-6728.
- Gassner, G. (1918): Ein neuer Dreifarbenährboden zur Typhus-Ruhr-Diagnose, Zentralbl. Bakteriol Parasitenkd Infektionskr, Abt. 1, Orig 80, Seite 219-222.
- Gauthier, A.; Puente, J. L. und Finlay, B. B. (2003): Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization, Infect Immun 71 [6], Seite 3310-3319.
- Gedek, B.; Kirchgessner, M.; Wiehler, S.; Bott, A.; Eidelsburger, U. und Roth, F. X. (1993): Zur nutritiven Wirksamkeit von *Bacillus cereus* als Probiotikum in der Ferkelaufzucht. 2. Mitteilung- Einfluss auf Keimzahlen, Zusammensetzung und Resistenzeigenschaften der gastrointestinalen und faecalen Mikroflora, Arch Tierernähr 44 [3], Seite 215-226.
- Girard, F.; Batisson, I.; Frankel, G. M.; Harel, J. und Fairbrother, J. M. (2005): Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence, Infect Immun 73 [9], Seite 6005-6016.
- Girón, J. A.; Ho, A. S. und Schoolnik, G. K. (1991): An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*, Science 254 [5032], Seite 710-713.
- Girón, J. A.; Torres, A. G.; Freer, E. und Kaper, J. B. (2002): The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells, Mol Microbiol 44 [2], Seite 361-379.
- Goldberg, M. D.; Johnson, M.; Hinton, J. C. und Williams, P. H. (2001): Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*, Mol Microbiol 41 [3], Seite 549-559.

- Gómez-Duarte, O. G. und Kaper, J. B. (1995): A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun* 63 [5], Seite 1767-1776.
- Goosney, D. L.; DeVinney, R. und Finlay, B. B. (2001): Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals, *Infect Immun* 69 [5], Seite 3315-3322.
- Gophna, U.; Oelschlaeger, T. A.; Hacker, J. und Ron, E. Z. (2002): Role of fibronectin in curli-mediated internalization, *FEMS Microbiol Lett* 212 [1], Seite 55-58.
- Gottlieb, M. und Chavko, M. (1987): Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels, *Anal Biochem* 165 [1], Seite 33-37.
- Gottschalk, G. (1986): *Bacterial metabolism*, 2. ed. Auflage, Springer, Berlin.
- Grozdanov, L.; Raasch, C.; Schulze, J.; Sonnenborn, U.; Gottschalk, G.; Hacker, J. und Dobrindt, U. (2004): Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917, *J Bacteriol* 186 [16], Seite 5432-5441.
- Grozdanov, L.; Zähringer, U.; Blum-Oehler, G.; Brade, L.; Henne, A.; Knirel, Y. A.; Schombel, U.; Schulze, J.; Sonnenborn, U.; Gottschalk, G.; Hacker, J.; Rietschel, E. T. und Dobrindt, U. (2002): A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917, *J Bacteriol* 184 [21], Seite 5912-5925.
- Gruenheid, S.; DeVinney, R.; Blatt, F.; Goosney, D.; Gelkop, S.; Gish, G. D.; Pawson, T. und Finlay, B. B. (2001): Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells, *Nat Cell Biol* 3 [9], Seite 856-859.
- Gumbiner, B. M. (1993): Breaking through the tight junction barrier, *J Cell Biol* 123 [6], Seite 1631-1633.
- Gunzburg, S. T.; Tornieporth, N. G. und Riley, L. W. (1995): Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene, *J Clin Microbiol* 33 [5], Seite 1375-1377.
- Haenel, H. (1982): *Mikroökologie - zur Begriffsbestimmung*, Bernhardt, H. und Knoke, M., *Mikroökologie des Magen-Darm-Kanals des Menschen* Seite 15-18, Ambrosius Barth Verlag, Leipzig.
- Hanajima-Ozawa, M.; Matsuzawa, T.; Fukui, A.; Kamitani, S.; Ohnishi, H.; Abe, A.; Horiguchi, Y. und Miyake, M. (2007): Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, and *Listeria monocytogenes* recruit a junctional protein, zonula occludens-1, to actin tails and pedestals, *Infect Immun* 75 [2], Seite 565-573.
- Hardwidge, P. R.; Deng, W.; Vallance, B. A.; Rodriguez-Escudero, I.; Cid, V. J.; Molina, M. und Finlay, B. B. (2005): Modulation of host cytoskeleton function by the enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* effector protein EspG, *Infect Immun* 73 [5], Seite 2586-2594.
- Helwig, U.; Lammers, K. M.; Rizzello, F.; Brigidi, P.; Rohleder, V.; Caramelli, E.; Gionchetti, P.; Schrezenmeir, J.; Foelsch, U. R.; Schreiber, S. und Campieri, M. (2006): *Lactobacilli*, *bifidobacteria* and *E. coli* nissle induce pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells, *World J Gastroenterol* 12 [37], Seite 5978-5986.

- Hendrickson, B. A.; Guo, J.; Laughlin, R.; Chen, Y. und Alverdy, J. C. (1999): Increased type 1 fimbrial expression among commensal *Escherichia coli* isolates in the murine cecum following catabolic stress, *Infect Immun* 67 [2], Seite 745-753.
- Henker, J.; Laass, M.; Blokhin, B. M.; Bolbot, Y. K.; Maydannik, V. G.; Elze, M.; Wolff, C. und Schulze, J. (2007): The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers, *Eur J Pediatr* 166 [4], Seite 311-318.
- Henker, J.; Laass, M. W.; Blokhin, B. M.; Maydannik, V. G.; Bolbot, Y. K.; Elze, M.; Wolff, C.; Schreiner, A. und Schulze, J. (2008): Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Versus Placebo for Treating Diarrhea of Greater Than 4 Days Duration in Infants and Toddlers, *Pediatr Infect Dis J* 27 [6], Seite 494-499.
- Hernandes, R. T.; Vieira, M. A.; Carneiro, S. M.; Salvador, F. A. und Gomes, T. A. (2006): Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus, *J Clin Microbiol* 44 [11], Seite 4214-4217.
- Hill, J. E.; Seipp, R. P.; Betts, M.; Hawkins, L.; Van Kessel, A. G.; Crosby, W. L. und Hemmingsen, S. M. (2002): Extensive profiling of a complex microbial community by high-throughput sequencing, *Appl Environ Microbiol* 68 [6], Seite 3055-3066.
- Hinton, M.; Hampson, D. J.; Hampson, E. und Linton, A. H. (1985): A comparison of the ecology of *Escherichia coli* in the intestine of healthy unweaned pigs and pigs after weaning, *J Appl Bacteriol* 58 [5], Seite 471-477.
- Hirsch, K. (2005): Untersuchungen zur Beeinflussung der Mikrobiota im Dünndarm von Ferkeln nach Verfütterung einer enzysupplementierten Getreidediät unter Anwendung der 16 rRNA-Sondenhybridisierung., Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät, Freie Universität, Berlin.
- Hirsch, K.; Simon, O. und Vahjen, W. (2006): Einfluss eines Xylanase-Futterzusatzes auf *Lactobacillus* Spezies im Jejunum von Ferkeln., *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 119 [11-12], Seite 486-492.
- Holdeman, L. V.; Good, I. J. und Moore, W. E. (1976): Human fecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress, *Appl Environ Microbiol* 31 [3], Seite 359-375.
- Hopwood, D. E. und Hampson, D. J. (2003): Interactions between the intestinal microflora, diet and diarrhoea, and their influences on piglet health in the immediate post-weaning period., Pluske, J. R.; Le Dividich, J. und Verstegen, M. W. A., Weaning the pig - concepts and consequences. Seite 199-218, Wageningen Academic Publishers, Wageningen.
- Hueck, C. J. (1998): Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants, *Microbiol Mol Biol Rev* 62 [2], Seite 379-433.
- Huet, C.; Sahuquillo-Merino, C.; Coudrier, E. und Louvard, D. (1987): Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation, *J Cell Biol* 105 [1], Seite 345-357.
- Hunter, P. R. und Gaston, M. A. (1988): Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity, *J Clin Microbiol* 26 [11], Seite 2465-6.

- Ide, T.; Laarmann, S.; Greune, L.; Schillers, H.; Oberleithner, H. und Schmidt, M. A. (2001): Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*, *Cell Microbiol* 3 [10], Seite 669-679.
- Iizumi, Y.; Sagara, H.; Kabe, Y.; Azuma, M.; Kume, K.; Ogawa, M.; Nagai, T.; Gillespie, P. G.; Sasakawa, C. und Handa, H. (2007): The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function, *Cell Host Microbe* 2 [6], Seite 383-392.
- Iyoda, S. und Watanabe, H. (2005): ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *J Bacteriol* 187 [12], Seite 4086-4094.
- Jadamus, A.; Vahjen, W.; Schäfer, K. und Simon, O. (2002): Influence of the probiotic strain *Bacillus cereus* var. Toyoi on the development of enterobacterial growth and on selected parameters of bacterial metabolism in digesta samples of piglets, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 86 [1-2], Seite 42-54.
- Jagannatha, H. M.; Sharma, U. K.; Ramaseshan, T.; Surolia, A. und Balganes, T. S. (1991): Identification of carbohydrate structures as receptors for localised adherent enteropathogenic *Escherichia coli*, *Microb Pathog* 11 [4], Seite 259-268.
- Janßen, T.; Schwarz, C.; Preikschat, P.; Voss, M.; Philipp, H. C. und Wieler, L. H. (2001): Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis, *Int J Med Microbiol* 291 [5], Seite 371-378.
- Jarvis, K. G.; Girón, J. A.; Jerse, A. E.; McDaniel, T. K.; Sonnenberg, M. S. und Kaper, J. B. (1995): Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [17], Seite 7996-8000.
- Jensen, B. B. und Jørgensen, H. (1994): Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs, *Appl Environ Microbiol* 60 [6], Seite 1897-1904.
- Jepson, M. A.; Collares-Buzato, C. B.; Clark, M. A.; Hirst, B. H. und Simmons, N. L. (1995): Rapid disruption of epithelial barrier function by *Salmonella typhimurium* is associated with structural modification of intercellular junctions, *Infect Immun* 63 [1], Seite 356-359.
- Jerse, A. E.; Yu, J.; Tall, B. D. und Kaper, J. B. (1990): A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 [20], Seite 7839-7843.
- Jin, L. Z.; Marquardt, R. R. und Zhao, X. (2000): A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus, *Appl Environ Microbiol* 66 [10], Seite 4200-4204.
- Johnson, J. R.; Jelacic, S.; Schoening, L. M.; Clabots, C.; Shaikh, N.; Mobley, H. L. und Tarr, P. I. (2005): The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection, *Infect Immun* 73 [2], Seite 965-971.

- Jores, J.; Rumer, L. und Wieler, L. H. (2004): Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*, *Int J Med Microbiol* 294 [2-3], Seite 103-13.
- Jores, J.; Wagner, S.; Rumer, L.; Eichberg, J.; Laturnus, C.; Kirsch, P.; Schierack, P.; Tschäpe, H. und Wieler, L. H. (2005): Description of a 111-kb pathogenicity island (PAI) encoding various virulence features in the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype O103:H2, *Int J Med Microbiol* 294 [7], Seite 417-425.
- Kanamaru, K.; Kanamaru, K.; Tatsuno, I.; Tobe, T. und Sasakawa, C. (2000): Regulation of virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 by self-produced extracellular factors, *Biosci Biotechnol Biochem* 64 [11], Seite 2508-2511.
- Kaper, J. B.; Nataro, J. P. und Mobley, H. L. (2004): Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat Rev Microbiol* 2 [2], Seite 123-140.
- Kaper, J. B. und Sperandio, V. (2005): Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract, *Infect Immun* 73 [6], Seite 3197-3209.
- Katouli, M.; Lund, A.; Wallgren, P.; Kuhn, I.; Soderlind, O. und Mollby, R. (1997): Metabolic fingerprinting and fermentative capacity of the intestinal flora of pigs during pre- and post-weaning periods, *J Appl Microbiol* 83 [2], Seite 147-154.
- Katouli, M.; Lund, A.; Wallgren, P.; Kühn, I.; Söderlind, O. und Möllby, R. (1995): Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods, *Appl Environ Microbiol* 61 [2], Seite 778-783.
- Kelly, D. und King, T. P. (2001): Luminal bacteria: regulation of the gut function and immunity, Piva, A.; Bach Knudsen, K. E. und Lindberg, J. E., *Gut environment of pigs* Seite 113-131, Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Kenny, B. (1999): Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications, *Mol Microbiol* 31 [4], Seite 1229-1241.
- Kenny, B.; Abe, A.; Stein, M. und Finlay, B. B. (1997): Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract, *Infect Immun* 65 [7], Seite 2606-2612.
- Kenny, B.; DeVinney, R.; Stein, M.; Reinscheid, D. J.; Frey, E. A. und Finlay, B. B. (1997): Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells, *Cell* 91 [4], Seite 511-520.
- Kenny, B.; Ellis, S.; Leard, A. D.; Warawa, J.; Mellor, H. und Jepson, M. A. (2002): Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules, *Mol Microbiol* 44 [4], Seite 1095-1107.
- Kenny, B. und Finlay, B. B. (1995): Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 [17], Seite 7991-7995.
- Kenny, B. und Finlay, B. B. (1997): Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1, *Infect Immun* 65 [7], Seite 2528-2536.

- Kenny, B. und Jepson, M. (2000): Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria, *Cell Microbiol* 2 [6], Seite 579-590.
- Khan, A. S.; Kniep, B.; Oelschlaeger, T. A.; Van Die, I.; Korhonen, T. und Hacker, J. (2000): Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun* 68 [6], Seite 3541-3547.
- Kikuchi, T.; Mizunoe, Y.; Takade, A.; Naito, S. und Yoshida, S. (2005): Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells, *Microbiol Immunol* 49 [9], Seite 875-884.
- Kirchgessner, M.; Roth, F. X.; Eidelsburger, U. und Gedek, B. (1993): Zur nutritiven Wirksamkeit von *Bacillus cereus* als Probiotikum in der Ferkelaufzucht. 1. Mitteilung-Einfluss auf Wachstumsparameter und gastrointestinales Milieu, *Arch Tierernähr* 44 [2], Seite 111-121.
- Klemm, P. (1986): Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*, *EMBO J* 5 [6], Seite 1389-1393.
- Kleta, S.; Steinrück, H.; Breves, G.; Duncker, S.; Laturnus, C.; Wieler, L. H. und Schierack, P. (2006): Detection and distribution of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 clones in swine herds in Germany, *J Appl Microbiol* 101 [6], Seite 1357-1366.
- Knutton, S.; Baldwin, T.; Williams, P. H. und McNeish, A. S. (1989): Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Infect Immun* 57 [4], Seite 1290-1298.
- Knutton, S.; Rosenshine, I.; Pallen, M. J.; Nisan, I.; Neves, B. C.; Bain, C.; Wolff, C.; Dougan, G. und Frankel, G. (1998): A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells, *EMBO J* 17 [8], Seite 2166-2176.
- Köhler, W.; Eggers, H. J.; Fleischer, B.; Marre, R.; Pfister, H. und Pulverer, G. (2001): Medizinische Mikrobiologie, Urban & Fischer, München.
- Konowalchuk, J.; Speirs, J. I. und Stavric, S. (1977): Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*, *Infect Immun* 18 [3], Seite 775-779.
- Konstantinov, S. R.; Awati, A. A.; Williams, B. A.; Miller, B. G.; Jones, P.; Stokes, C. R.; Akkermans, A. D.; Smidt, H. und de Vos, W. M. (2006): Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities, *Environ Microbiol* 8 [7], Seite 1191-1199.
- Konstantinov, S. R.; Favier, C. F.; Zhu, W. Y.; Williams, B. A.; Klüß, J.; Souffrant, W.-B.; de Vos, W. M.; Akkermans, A. D. L. und Smidt, H. (2004): Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition, *Anim Res* 53, Seite 317-324.
- Kovács-Zomborszky, M.; Kreizinger, F.; Gombos, S. und Zomborszky, Z. (1994): Data on the effects of the probiotic "Lacto Sacc", *Acta Vet Hung* 42 [1], Seite 3-14.
- Krammer, H. J.; Kämper, H.; von Büнау, R.; Zieseniß, E.; Stange, C.; Schlieger, F.; Clever, I. und Schulze, J. (2006): Probiotische Arzneimitteltherapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN): Ergebnisse einer prospektiven Datenerhebung mit 3,807 Patienten, *Z Gastroenterol* 44 [8], Seite 651-656.

- Krause, G.; Zimmermann, S. und Beutin, L. (2005): Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types, *Vet Microbiol* 106 [1-2], Seite 87-95.
- Krivan, H. C.; Roberts, D. D. und Ginsburg, V. (1988): Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc β 1-4Gal found in some glycolipids, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 [16], Seite 6157-6161.
- Kruis, W.; Fric, P.; Pokrotnieks, J.; Lukaš, M.; Fixa, B.; Kaščak, M.; Kamm, M. A.; Weismueller, J.; Beglinger, C.; Stolte, M.; Wolff, C. und Schulze, J. (2004): Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine, *Gut* 53 [11], Seite 1617-1623.
- Kyriakis, S. C.; Tsioloyiannis, V. K.; Vlemmas, J.; Sarris, K.; Tsinas, A. C.; Alexopoulos, C. und Jansegers, L. (1999): The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets, *Res Vet Sci* 67 [3], Seite 223-228.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], Seite 680-685.
- Lane, M. C.; Lockett, V.; Monterosso, G.; Lamphier, D.; Weinert, J.; Hebel, J. R.; Johnson, D. E. und Mobley, H. L. (2005): Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract, *Infect Immun* 73 [11], Seite 7644-7656.
- Larson, M. A.; Wei, S. H.; Weber, A.; Mack, D. R. und McDonald, T. L. (2003): Human serum amyloid A3 peptide enhances intestinal MUC3 expression and inhibits EPEC adherence, *Biochem Biophys Res Commun* 300 [2], Seite 531-540.
- Lauková, A. und Cizková, S. (1998): Inhibition effect of enterocin CCM 4231 in the rumen fluid environment, *Lett Appl Microbiol* 26 [3], Seite 215-218.
- Lemon, K. P.; Higgins, D. E. und Kolter, R. (2007): Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation, *J Bacteriol* 189 [12], Seite 4418-4424.
- Leser, T. D.; Amenuvor, J. Z.; Jensen, T. K.; Lindecrone, R. H.; Boye, M. und Møller, K. (2002): Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited, *Appl Environ Microbiol* 68 [2], Seite 673-690.
- Leser, T. D.; Lindecrone, R. H.; Jensen, T. K.; Jensen, B. B. und Møller, K. (2000): Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*, *Appl Environ Microbiol* 66 [8], Seite 3290-3296.
- Liévin-Le Moal, V. und Servin, A. L. (2006): The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota, *Clin Microbiol Rev* 19 [2], Seite 315-337.
- Lindberg, S.; Xia, Y.; Sonden, B.; Göransson, M.; Hacker, J. und Uhlin, B. E. (2008): Regulatory Interactions among adhesin gene systems of uropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun* 76 [2], Seite 771-780.
- Lio, J. C. und Syu, W. J. (2004): Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *J Biomed Sci* 11 [6], Seite 855-863.

- Liu, H.; Magoun, L. und Leong, J. M. (1999): β_1 -chain integrins are not essential for intimin-mediated host cell attachment and enteropathogenic *Escherichia coli*-induced actin condensation, *Infect Immun* 67 [4], Seite 2045-2049.
- Liu, X. und Matsumura, P. (1995): An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization, *Gene* 164 [1], Seite 81-84.
- Lodemann, U.; Hübener, K.; Jansen, N. und Martens, H. (2006): Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets, *Arch Anim Nutr* 60 [1], Seite 35-48.
- Loew, D. (2001): Leben und Werk von Alfred Nissle, 4. Interdisziplinäres Symposium Darmflora in Symbiose und Pathogenität: Mikrobiologische Grundlagen und klinische Anwendung von *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917, Berlin, 10.-11. November 2000 Seite 11-19, Alfred-Nissle-Gesellschaft e. V., Hagen.
- Lorenz, B. (2006): Wirkung von *Bacillus cereus* auf transportphysiologische Parameter des mittleren Jejunums von Ferkeln, Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät, Freie Universität, Berlin.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193 [1], Seite 265-275.
- Luli, G. W. und Strohl, W. R. (1990): Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations, *Appl Environ Microbiol* 56 [4], Seite 1004-1011.
- Lyczak, J. B. (2003): Commensal bacteria increase invasion of intestinal epithelium by *Salmonella enterica* serovar *Typhi*, *Infect Immun* 71 [11], Seite 6610-6604.
- Mack, D. R.; Ahrne, S.; Hyde, L.; Wei, S. und Hollingsworth, M. A. (2003): Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro, *Gut* 52 [6], Seite 827-833.
- Mack, D. R. und Lebel, S. (2004): Role of probiotics in the modulation of intestinal infections and inflammation, *Curr Opin Gastroenterol* 20 [1], Seite 22-26.
- Mack, D. R.; Michail, S.; Wei, S.; McDougall, L. und Hollingsworth, M. A. (1999): Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276 [4], Seite G941-G950.
- Mackie, R. I.; Sghir, A. und Gaskins, H. R. (1999): Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract, *Am J Clin Nutr* 69 [5], Seite 1035S-1045S.
- Malik, A.; Tóth, I.; Beutin, L.; Schmidt, H.; Taminiau, B.; Dow, M. A.; Morabito, S.; Oswald, E.; Mainil, J. und Nagy, B. (2006): Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae*⁺ *Escherichia coli* from weaned pigs, *Vet Microbiol* 114 [1-2], Seite 82-93.
- Marteau, P. R.; de Vrese, M.; Cellier, C. J. und Schrezenmeir, J. (2001): Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics, *Am J Clin Nutr* 73 [2 Suppl], Seite 430S-436S.
- Martinez, J. J.; Mulvey, M. A.; Schilling, J. D.; Pinkner, J. S. und Hultgren, S. J. (2000): Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells, *EMBO J* 19 [12], Seite 2803-2812.

- Maurer, J. J.; Brown, T. P.; Steffens, W. L. und Thayer, S. G. (1998): The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*, Avian Dis 42 [1], Seite 106-118.
- McDaniel, T. K.; Jarvis, K. G.; Sonnenberg, M. S. und Kaper, J. B. (1995): A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens, Proc Natl Acad Sci U S A 92 [5], Seite 1664-1668.
- McNamara, B. P.; Koutsouris, A.; O'Connell, C. B.; Nougayrède, J. P.; Sonnenberg, M. S. und Hecht, G. (2001): Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function, J Clin Invest 107 [5], Seite 621-629.
- Meberg, P. J.; Ono, S.; Minamide, L. S.; Takahashi, M. und Bamberg, J. R. (1998): Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension, Cell Motil Cytoskeleton 39 [2], Seite 172-190.
- Medellin-Pena, M. J.; Wang, H.; Johnson, R.; Anand, S. und Griffiths, M. W. (2007): Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7, Appl Environ Microbiol 73 [13], Seite 4259-4267.
- Mellies, J. L.; Elliott, S. J.; Sperandio, V.; Sonnenberg, M. S. und Kaper, J. B. (1999): The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler), Mol Microbiol 33 [2], Seite 296-306.
- Merlino, J.; Siarakas, S.; Robertson, G. J.; Funnell, G. R.; Gottlieb, T. und Bradbury, R. (1996): Evaluation of CHROMagar Orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and *Enterococcus* species, J Clin Microbiol 34 [7], Seite 1788-1793.
- Mitra, A. K. und Rabbani, G. H. (1990): A double-blind, controlled trial of bioflorin (*Streptococcus faecium* SF68) in adults with acute diarrhea due to *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*, Gastroenterology 99 [4], Seite 1149-1152.
- Moon, H. W.; Whipp, S. C.; Argenzio, R. A.; Levine, M. M. und Giannella, R. A. (1983): Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines, Infect Immun 41 [3], Seite 1340-1351.
- Moore, W. E. und Holdeman, L. V. (1974): Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians, Appl Microbiol 27 [5], Seite 961-979.
- Moore, W. E.; Moore, L. V.; Cato, E. P.; Wilkins, T. D. und Kornegay, E. T. (1987): Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine, Appl Environ Microbiol 53 [7], Seite 1638-1644.
- Mukai, T.; Kaneko, S.; Matsumoto, M. und Ohori, H. (2004): Binding of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin, Int J Food Microbiol 90 [3], Seite 357-362.
- Muza-Moons, M. M.; Schneeberger, E. E. und Hecht, G. A. (2004): Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junction strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells, Cell Microbiol 6 [8], Seite 783-793.
- Nakano, K.; Rischke, M.; Sato, S. und Märkl, H. (1997): Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high-cell-density cultivation in a dialysis reactor, Appl Microbiol Biotechnol 48 [5], Seite 597-601.

- Nataro, J. P. und Kaper, J. B. (1998): Diarrheagenic *Escherichia coli*, Clin Microbiol Rev 11 [1], Seite 142-201.
- Neeser, J. R.; Granato, D.; Rouvet, M.; Servin, A.; Teneberg, S. und Karlsson, K. A. (2000): *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria, Glycobiology 10 [11], Seite 1193-1199.
- Neidhardt, F.C. (1987): *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology, ASM Press, Washington, D.C.
- Nhieu, G. T. V. und Sansonetti, P. J. (2000): Cell adhesion molecules and bacterial pathogens, Cossart, P.; Boquet, P.; Normark, S. und Rappuoli, R., Cellular microbiology Seite 97-111, ASM Press, Washington, D.C.
- Nissle, A. (1918): Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstörungen mit Kolibakterien, Med Klin 2, Seite 29-30.
- Nordfelth, R.; Kauppi, A. M.; Norberg, H. A.; Wolf-Watz, H. und Elofsson, M. (2005): Small-molecule inhibitors specifically targeting type III secretion, Infect Immun 73 [5], Seite 3104-3114.
- O'Neil, H. S. und Marquis, H. (2006): *Listeria monocytogenes* flagella are used for motility, not as adhesins, to increase host cell invasion, Infect Immun 74 [12], Seite 6675-6681.
- Ofek, I. und Doyle, R. J. (1994): Bacterial adhesion to cells and tissues, Chapman & Hall, New York.
- Ogura, Y.; Ooka, T.; Whale, A.; Garmendia, J.; Beutin, L.; Tennant, S.; Krause, G.; Morabito, S.; Chinen, I.; Tobe, T.; Abe, H.; Tozzoli, R.; Caprioli, A.; Rivas, M.; Robins-Browne, R.; Hayashi, T. und Frankel, G. (2007): TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization, Infect Immun 75 [2], Seite 604-612.
- Ohnishi, K.; Kutsukake, K.; Suzuki, H. und Iino, T. (1990): Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*, Mol Gen Genet 221 [2], Seite 139-147.
- Okeke, I. N.; Borneman, J. A.; Shin, S.; Mellies, J. L.; Quinn, L. E. und Kaper, J. B. (2001): Comparative sequence analysis of the plasmid-encoded regulator of enteropathogenic *Escherichia coli* Strains, Infect Immun 69 [9], Seite 5553-5564.
- Olsén, A.; Arnqvist, A.; Hammar, M. und Normark, S. (1993): Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*, Infect Agents Dis 2 [4], Seite 272-274.
- Olsén, A.; Jonsson, A. und Normark, S. (1989): Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*, Nature 338 [6217], Seite 652-655.
- Oswald, E.; Schmidt, H.; Morabito, S.; Karch, H.; Marchés, O. und Caprioli, A. (2000): Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant, Infect Immun 68 [1], Seite 64-71.
- Oswald, I. P. (2006): Role of intestinal epithelial cells in the innate immune defence of the pig intestine, Vet Res 37 [3], Seite 359-368.
- Otte, J. M. und Podolsky, D. K. (2004): Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 286 [4], Seite G613-G626.

- Ottemann, K. M. und Miller, J. F. (1997): Roles for motility in bacterial-host interactions, *Mol Microbiol* 24 [6], Seite 1109-1117.
- Ouwehand, A. C.; Salminen, S. und Isolauri, E. (2002): Probiotics: an overview of beneficial effects, *Antonie Van Leeuwenhoek* 82 [1-4], Seite 279-289.
- Pallen, M. J.; Beatson, S. A. und Bailey, C. M. (2005): Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion, *BMC Microbiol* 5 [1], Seite 9, Online-Veröffentlichung.
- Papatheodorou, P.; Domńska, G.; Öxle, M.; Mathieu, J.; Selchow, O.; Kenny, B. und Rassow, J. (2006): The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology, *Cell Microbiol* 8 [4], Seite 677-689.
- Parkes, G. C. (2007): An overview of probiotics and prebiotics, *Nurs Stand* 21 [20], Seite 43-47.
- Paton, A. W.; Beutin, L. und Paton, J. C. (1995): Heterogeneity of the amino-acid sequences of *Escherichia coli* Shiga-like toxin type-I operons, *Gene* 153 [1], Seite 71-74.
- Patzer, S. I.; Baquero, M. R.; Bravo, D.; Moreno, F. und Hantke, K. (2003): The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN, *Microbiology* 149 [9], Seite 2557-2570.
- Penders, J.; Thijs, C.; Vink, C.; Stelma, F. F.; Snijders, B.; Kummeling, I.; van den Brandt, P. A. und Stobberingh, E. E. (2006): Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy, *Pediatrics* 118 [2], Seite 511-521.
- Pere, A.; Leinonen, M.; Väisänen-Rhen, V.; Rhen, M. und Korhonen, T. K. (1985): Occurrence of type-1C fimbriae on *Escherichia coli* strains isolated from human extraintestinal infections, *J Gen Microbiol* 131 [7], Seite 1705-1711.
- Perna, N. T.; Mayhew, G. F.; Pósfai, G.; Elliott, S.; Sonnenberg, M. S.; Kaper, J. B. und Blattner, F. R. (1998): Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Infect Immun* 66 [8], Seite 3810-3817.
- Phillips, N.; Hayward, R. D. und Koronakis, V. (2004): Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation, *Nat Cell Biol* 6 [7], Seite 618-625.
- Pittard, A. J. (1987): Biosynthesis of the aromatic amino acids., Neidhardt, F.C., *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Vol. 1 Seite 368-394, ASM Press, Washington, D.C.
- Pizarro-Cerda, J. und Cossart, P. (2006): Bacterial adhesion and entry into host cells, *Cell* 124 [4], Seite 715-727.
- Pollmann, M.; Nordhoff, M.; Pospischil, A.; Tedin, K. und Wieler, L. H. (2005): Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine, *Infect Immun* 73 [7], Seite 4346-4353.
- Ramos, H. C.; Rumbo, M. und Sirard, J. C. (2004): Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa, *Trends Microbiol* 12 [11], Seite 509-517.

- Reiter, K.; Eggebrecht, S.; Drewes, B.; Riess, M. und Weyrauch, K. D. (2006): Effects of *Enterococcus faecium* and *Bacillus cereus* var. Toyoi on the morphology of the intestinal mucous membrane in piglets, *Biologia* 61 [6], Seite 803-809.
- Resta-Lenert, S. und Barrett, K. E. (2003): Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC), *Gut* 52 [7], Seite 988-997.
- Roberfroid, M. B. (2000): Prebiotics and probiotics: are they functional foods?, *Am J Clin Nutr* 71 (suppl. 6), Seite 1682S-1687S.
- Robinson, I. M.; Allison, M. J. und Bucklin, J. A. (1981): Characterization of the cecal bacteria of normal pigs, *Appl Environ Microbiol* 41 [4], Seite 950-955.
- Roselli, M.; Finamore, A.; Britti, M. S.; Konstantinov, S. R.; Smidt, H.; de Vos, W. M. und Mengheri, E. (2007): The novel porcine *Lactobacillus sobrius* strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage, *J Nutr* 137 [12], Seite 2709-2716.
- Rumer, L.; Jores, J.; Kirsch, P.; Cavnagac, Y.; Zehmke, K. und Wieler, L. H. (2003): Dissemination of *pheU*- and *pheV*-located genomic islands among enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *E. coli* and their possible role in the horizontal transfer of the locus of enterocyte effacement (LEE), *Int J Med Microbiol* 292 [7-8], Seite 463-475.
- Russel, E. G. (1979): Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs, *Appl Environ Microbiol* 37 [2], Seite 187-193.
- Saarela, M.; Mogensen, G.; Fondén, R.; Mättö, J. und Mattila-Sandholm, T. (2000): Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties, *J Biotechnol* 84 [3], Seite 197-215.
- Salanitro, J. P.; Blake, I. G. und Muirhead, P. A. (1977): Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine, *Appl Environ Microbiol* 33 [1], Seite 79-84.
- Salysers, A. A. (2006): Activities og human colonic microbes, Ending the war metaphor. The changing agenda for unraveling the host-microbe relationship Seite 53-73, National Academy Press, Washington, D.C.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2. ed. Auflage, Cold Spring Habor Laboratory Press, New York.
- Sansonetti, P. J.; Tran Van Nhieu, G. und Égile, C. (1999): Rupture of the intestinal epithelial barrier and mucosal invasion by *Shigella flexneri*, *Clin Infect Dis* 28 [3], Seite 466-475.
- Savage, D. C. (1977): Interactions between the host and its microbes, Clark, R. T. J. und Bauchop, T., *Microbial ecology of the gut* Seite 277-310, Academic Press, London.
- Savage, D. C. (1987): Microorganisms associated with epithelial surfaces and stability of the indigenous gastrointestinal microflora, *Nahrung* 31 [5-6], Seite 383-95.
- Savage, D. C. (1999): Mucosal Microbiota, Ogra, P. I.; Mestecky, J.; Lamm, M. E.; Strober, W.; Bienenstock, J. und Mc Ghee, J. R., *Mucosal Immunology*, 2. Auflage, Seite 19-30, Academic Press, San Diego, CA.
- Scaletsky, I. C.; Michalski, J.; Torres, A. G.; Dulguer, M. V. und Kaper, J. B. (2005): Identification and characterization of the locus for diffuse adherence, which encodes a novel afimbrial adhesin found in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*, *Infect Immun* 73 [8], Seite 4753-4765.

- Scharek, L.; Altherr, B. J.; Tölke, C. und Schmidt, M. F. (2007): Influence of the probiotic *Bacillus cereus* var. Toyoi on the intestinal immunity of piglets, *Vet Immunol Immunopathol* 120 [3-4], Seite 136-147.
- Scharek, L.; Guth, J.; Filter, M. und Schmidt, M. F. (2007): Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets, *Arch Anim Nutr* 61 [4], Seite 223-234.
- Scharek, L.; Guth, J.; Reiter, K.; Weyrauch, K. D.; Taras, D.; Schwerk, P.; Schierack, P.; Schmidt, M. F.; Wieler, L. H. und Tedin, K. (2005): Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets, *Vet Immunol Immunopathol* 105 [1-2], Seite 151-161.
- Schauer, D. B. und Falkow, S. (1993): Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia, *Infect Immun* 61 [6], Seite 2486-2492.
- Schechter, L. M.; Jain, S.; Akbar, S. und Lee, C. A. (2003): The small nucleoid-binding proteins H-NS, HU, and Fis affect *hilA* expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Infect Immun* 71 [9], Seite 5432-5435.
- Schierack, P.; Nordhoff, M.; Pollmann, M.; Weyrauch, K. D.; Amasheh, S.; Lodemann, U.; Jores, J.; Tachu, B.; Kleta, S.; Blikslager, A.; Tedin, K. und Wieler, L. H. (2006): Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine, *Histochem Cell Biol* 125 [3], Seite 293-305.
- Schierack, P.; Steinruck, H.; Kleta, S. und Vahjen, W. (2006): Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs, *Appl Environ Microbiol* 72 [10], Seite 6680-6686.
- Schierack, P.; Walk, N.; Ewers, C.; Wilking, H.; Steinruck, H.; Filter, M. und Wieler, L. H. (2008): ExPEC-typical virulence-associated genes correlate with successful colonization by intestinal *E. coli* in a small piglet group, *Environ Microbiol* 10 [7], Seite 1742-1751.
- Schierack, P.; Walk, N.; Reiter, K.; Weyrauch, K. D. und Wieler, L. H. (2007): Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs, *Microbiology* 153 [11], Seite 3830-3837.
- Schierack, P.; Wieler, L. H.; Taras, D.; Herwig, V.; Tachu, B.; Hlinak, A.; Schmidt, M. F. und Scharek, L. (2007): *Bacillus cereus* var. Toyoi enhanced systemic immune response in piglets, *Vet Immunol Immunopathol* 118 [1-2], Seite 1-11.
- Schlee, M.; Wehkamp, J.; Altenhoefer, A.; Oelschlaeger, T. A.; Stange, E. F. und Fellermann, K. (2007): Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin, *Infect Immun* 75 [5], Seite 2399-2407.
- Schroeder, B.; Duncker, S.; Barth, S.; Bauerfeind, R.; Gruber, A. D.; Deppenmeier, S. und Breves, G. (2006): Preventive effects of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute secretory diarrhea in a pig model of intestinal infection, *Dig Dis Sci* 51 [4], Seite 724-731.
- Schultz, M.; Strauch, U. G.; Linde, H. J.; Watzl, S.; Obermeier, F.; Göttl, C.; Dunger, N.; Grunwald, N.; Schölmerich, J. und Rath, H. C. (2004): Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle

- 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis, Clin Diagn Lab Immunol 11 [2], Seite 372-378.
- Seelig, B. (2007): Einfluss der Probiotika *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB 10415) und *Bacillus cereus* var. Toyoi auf die Saure und Alkalische Phosphatase sowie auf die endokrinen Zellen der intestinalen Schleimhaut des Ferkels, Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät, Freie Universität, Berlin.
- Selander, R. K.; Caugant, D. A. und Whittam, T. S. (1987): Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*, Neidhardt, F.C., *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*: Cellular and Molecular Biology Seite 1625-1648, ASM Press, Washington, D.C.
- Shaner, N. C.; Sanger, J. W. und Sanger, J. M. (2005): Actin and alpha-actinin dynamics in the adhesion and motility of EPEC and EHEC on host cells, Cell Motil Cytoskeleton 60 [2], Seite 104-120.
- Sharma, V. K. und Zuerner, R. L. (2004): Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, J Bacteriol 186 [21], Seite 7290-7301.
- Sheth, H. B.; Lee, K. K.; Wong, W. Y.; Srivastava, G.; Hindsgaul, O.; Hodges, R. S.; Paranchych, W. und Irvin, R. T. (1994): The pili of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO bind specifically to the carbohydrate sequence β GalNAc(1-4) β Gal found in glycosphingolipids asialo-GM1 and asialo-GM2, Mol Microbiol 11 [4], Seite 715-723.
- Shu, Q.; Qu, F. und Gill, H. S. (2001): Probiotic treatment using Bifidobacterium lactis HN019 reduces weanling diarrhea associated with rotavirus and Escherichia coli infection in a piglet model, J Pediatr Gastroenterol Nutr 33 [2], Seite 171-177.
- Siitonen, A.; Martikainen, R.; Ikäheimo, R.; Palmgren, J. und Mäkelä, P. H. (1993): Virulence-associated characteristics of *Escherichia coli* in urinary tract infection: a statistical analysis with special attention to type 1C fimbriation, Microb Pathog 15 [1], Seite 65-75.
- Simon, O.; Vahjen, W. und Taras, D. (2004): Ernährung und intestinale Mikrobiota bei Schwein und Geflügel, Mikrobiologie und Tierernährung: 20. Hülseberger Gespräche 2004, Lübeck, 9.-11. Juni 2004 Seite 112-124, H. Wilhelm Schaumann-Stiftung, Hamburg.
- Simpson, J. M.; McCracken, V. J.; White, B. A.; Gaskins, H. R. und Mackie, R. I. (1999): Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota, J Microbiol Methods 36 [3], Seite 167-179.
- Sinclair, J. F. und O'Brien, A. D. (2004): Intimin types α , β , and γ bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor, J Biol Chem 279 [32], Seite 33751-33758.
- Smith, H. W. (1965): The development of the flora of the alimentary tract in young animals, J Pathol Bacteriol 90 [2], Seite 495-513.
- Snyder, J. A.; Haugen, B. J.; Buckles, E. L.; Lockatell, C. V.; Johnson, D. E.; Sonnenberg, M. S.; Welch, R. A. und Mobley, H. L. (2004): Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection, Infect Immun 72 [11], Seite 6373-6381.
- Snyder, J. A.; Haugen, B. J.; Lockatell, C. V.; Maroncle, N.; Hagan, E. C.; Johnson, D. E.; Welch, R. A. und Mobley, H. L. (2005): Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*, Infect Immun 73 [11], Seite 7588-7596.

- Sokolowska-Köhler, W.; Schöniat, G.; Bollmann, R.; Schubert, A.; Parschau, J.; Seeberg, A. und Presber, W. (1997): Occurrence of S and F1C/S-related fimbrial determinants and their expression in *Escherichia coli* strains isolated from extraintestinal infections, FEMS Immunol Med Microbiol 18 [1], Seite 1-6.
- Solano-Aguilar, G. I.; Vengroski, K. G.; Beshah, E. und Lunney, J. K. (2000): Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine, J Immunol Methods 241 [1-2], Seite 185-199.
- Sperandio, V.; Kaper, J. B.; Bortolini, M. R.; Neves, B. C.; Keller, R. und Trabulsi, L. R. (1998): Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes, FEMS Microbiol Lett 164 [1], Seite 133-139.
- Sperandio, V.; Li, C. C. und Kaper, J. B. (2002): Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*, Infect Immun 70 [6], Seite 3085-3093.
- Sperandio, V.; Mellies, J. L.; Nguyen, W.; Shin, S. und Kaper, J. B. (1999): Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*, Proc Natl Acad Sci U S A 96 [26], Seite 15196-15201.
- Stentebjerg-Olesen, B.; Chakraborty, T. und Klemm, P. (2000): FimE-catalyzed off-to-on inversion of the type 1 fimbrial phase switch and insertion sequence recruitment in an *Escherichia coli* K-12 *fimB* strain, FEMS Microbiol Lett 182 [2], Seite 319-325.
- Sturm, A.; Rilling, K.; Baumgart, D. C.; Gargas, K.; Abou-Ghazalé, T.; Raupach, B.; Eckert, J.; Schumann, R. R.; Enders, C.; Sonnenborn, U.; Wiedenmann, B. und Dignass, A. U. (2005): *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling, Infect Immun 73 [3], Seite 1452-1465.
- Sudo, N.; Sawamura, S.; Tanaka, K.; Aiba, Y.; Kubo, C. und Koga, Y. (1997): The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction, J Immunol 159 [4], Seite 1739-1745.
- Sun, J.; Gunzer, F.; Westendorf, A. M.; Buer, J.; Scharfe, M.; Jarek, M.; Gößling, F.; Blöcker, H. und Zeng, A. P. (2005): Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data, J Biotechnol 117 [2], Seite 147-161.
- Swimm, A.; Bommarius, B.; Li, Y.; Cheng, D.; Reeves, P.; Sherman, M.; Veach, D.; Bornmann, W. und Kalman, D. (2004): Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals, Mol Biol Cell 15 [8], Seite 3520-3529.
- Swords, W. E.; Wu, C. C.; Champlin, F. R. und Buddington, R. K. (1993): Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora, Biol Neonate 63 [3], Seite 191-200.
- Tannock, G. W. (1995): Normal microflora: an introduction to microbes inhabiting the human body, Chapman & Hall, London.

- Taras, D.; Vahjen, W.; Macha, M. und Simon, O. (2005): Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. Toyoi to sows and piglets, Arch Anim Nutr 59 [6], Seite 405-417.
- Taras, D.; Vahjen, W.; Macha, M. und Simon, O. (2006): Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets, J Anim Sci 84 [3], Seite 608-617.
- Taras, D.; Vahjen, W. und Simon, O. (2007): Probiotics in pigs - modulation of their intestinal distribution and their impact on the health and performance, Livestock Science 108, Seite 229-231.
- Tarr, P. I.; Bilge, S. S.; Vary, J. C., Jr.; Jelacic, S.; Habeeb, R. L.; Ward, T. R.; Baylor, M. R. und Besser, T. E. (2000): Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure, Infect Immun 68 [3], Seite 1400-1407.
- Theppangna, W.; Murase, T.; Tokumaru, N.; Chikumi, H.; Shimizu, E. und Otsuki, K. (2007): Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins, J Vet Med Sci 69 [12], Seite 1235-1239.
- Thomas, N. A.; Deng, W.; Baker, N.; Puente, J. und Finlay, B. B. (2007): Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*, J Biol Chem 282 [40], Seite 29634-29645.
- Traskalová-Hogenová, H.; Štěpánková, R.; Hudcovic, T.; Tucková, L.; Cukrowska, B.; Lodinová-Žádníková, R.; Kozáková, H.; Rossmann, P.; Bártová, J.; Sokol, D.; Funda, D. P.; Borovská, D.; Reháková, Z.; Šinkora, J.; Hofman, J.; Drastich, P. und Kokešová, A. (2004): Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases, Immunol Lett 93 [2-3], Seite 97-108.
- Tobe, T.; Hayashi, T.; Han, C. G.; Schoolnik, G. K.; Ohtsubo, E. und Sasakawa, C. (1999): Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid, Infect Immun 67 [10], Seite 5455-5462.
- Tobe, T.; Schoolnik, G. K.; Sohel, I.; Bustamante, V. H. und Puente, J. L. (1996): Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*, Mol Microbiol 21 [5], Seite 963-975.
- Tobe, T.; Yoshikawa, M.; Mizuno, T. und Sasakawa, C. (1993): Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella flexneri*: activation by VirF and repression by H-NS, J Bacteriol 175 [19], Seite 6142-6149.
- Tomoyasu, T.; Takaya, A.; Handa, Y.; Karata, K. und Yamamoto, T. (2005): ClpXP controls the expression of LEE genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, FEMS Microbiol Lett 253 [1], Seite 59-66.
- Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, Proc Natl Acad Sci U S A 76 [9], Seite 4350-4354.
- Trabulsi, L. R.; Keller, R. und Tardelli Gomes, T. A. (2002): Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*, Emerg Infect Dis 8 [5], Seite 508-513.

- Tran, H. J.; Heroven, A. K.; Winkler, L.; Spreter, T.; Beatrix, B. und Dersch, P. (2005): Analysis of RovA, a transcriptional regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence that acts through antirepression and direct transcriptional activation, *J Biol Chem* 280 [51], Seite 42423-42432.
- Tromm, A.; Niewerth, U.; Khoury, M.; Baestlein, E.; Wilhelms, G.; Schulze, J. und Stolte, M. (2004): The probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 for the treatment of collagenous colitis: first results of an open-label trial, *Z Gastroenterol* 42 [5], Seite 365-369.
- Ukena, S. N.; Singh, A.; Dringenberg, U.; Engelhardt, R.; Seidler, U.; Hansen, W.; Bleich, A.; Bruder, D.; Franzke, A.; Rogler, G.; Suerbaum, S.; Buer, J.; Gunzer, F. und Westendorf, A. M. (2007): Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut by Enhancing Mucosal Integrity, *PLoS ONE* 2 [12], Seite e1308, Online-Veröffentlichung.
- Ukena, S. N.; Westendorf, A. M.; Hansen, W.; Rohde, M.; Geffers, R.; Coldewey, S.; Suerbaum, S.; Buer, J. und Gunzer, F. (2005): The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-1, *BMC Med Genet* 6, Seite 43-55, Online-Veröffentlichung.
- Umanski, T.; Rosenshine, I. und Friedberg, D. (2002): Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*, *Microbiology* 148 [9], Seite 2735-2744.
- Underdahl, N. R. (1983): The effect of feeding *Streptococcus faecium* upon *Escherichia coli* induced diarrhea in gnotobiotic pigs, *Prog Food Nutr Sci* 7 [3-4], Seite 5-12.
- Unsworth, K. E.; Mazurkiewicz, P.; Senf, F.; Zettl, M.; McNiven, M.; Way, M. und Holden, D. W. (2007): Dynamin is required for F-actin assembly and pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), *Cell Microbiol* 9 [2], Seite 438-449.
- Vahjen, W.; Jadamus, A. und Simon, O. (2002): Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults, *Arch Tierernähr* 56 [6], Seite 419-429.
- Valdéz, J. C.; Peral, M. C.; Rachid, M.; Santana, M. und Perdigón, G. (2005): Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment, *Clin Microbiol Infect* 11 [6], Seite 472-479.
- Van Soest, P.J. (2004): Nutritional ecology of the ruminant, 2. ed. Auflage, Cornell University Press, Ithaka, NY.
- Varel, V. H. und Yen, J. T. (1997): Microbial perspective on fiber utilization by swine, *J Anim Sci* 75 [10], Seite 2715-2722.
- Veldhuizen, E. J.; Hendriks, H. G.; Hogenkamp, A.; van Dijk, A.; Gaastra, W.; Tooten, P. C. und Haagsman, H. P. (2006): Differential regulation of porcine β -defensins 1 and 2 upon *Salmonella* infection in the intestinal epithelial cell line IPI-2I, *Vet Immunol Immunopathol* 114 [1-2], Seite 94-102.
- Veldhuizen, E. J.; Rijnders, M.; Claassen, E. A.; van Dijk, A. und Haagsman, H. P. (2008): Porcine β -defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria, *Mol Immunol* 45 [2], Seite 386-394.
- Veldhuizen, E. J.; van Dijk, A.; Tersteeg, M. H.; Kalkhove, S. I.; van der Meulen, J.; Niewold, T. A. und Haagsman, H. P. (2007): Expression of β -defensins pBD-1 and pBD-2 along the small

- intestinal tract of the pig: lack of upregulation in vivo upon *Salmonella typhimurium* infection, Mol Immunol 44 [4], Seite 276-283.
- Virkola, R.; Westerlund, B.; Holthöfer, H.; Parkkinen, J.; Kekomäki, M. und Korhonen, T. K. (1988): Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder, Infect Immun 56 [10], Seite 2615-2622.
- von Buenau, R.; Jaekel, L.; Schubotz, E.; Schwarz, S.; Stroff, T. und Krueger, M. (2005): *Escherichia coli* strain Nissle 1917: significant reduction of neonatal calf diarrhea, J Dairy Sci 88 [1], Seite 317-323.
- Wang, X.; Rochon, M.; Lamprokostopoulou, A.; Lünsdorf, H.; Nimtz, M. und Römling, U. (2006): Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29, Cell Mol Life Sci 63 [19-20], Seite 2352-2363.
- Watnick, P. I. und Kolter, R. (1999): Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm, Mol Microbiol 34 [3], Seite 586-595.
- Wegener, H. C. (2003): Antibiotics in animal feed and their role in resistance development, Curr Opin Microbiol 6 [5], Seite 439-445.
- Wehkamp, J.; Harder, J.; Wehkamp, K.; Wehkamp-von Meissner, B.; Schlee, M.; Enders, C.; Sonnenborn, U.; Nuding, S.; Bengmark, S.; Fellermann, K.; Schroder, J. M. und Stange, E. F. (2004): NF- κ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium, Infect Immun 72 [10], Seite 5750-5758.
- Welch, R.A. (2006): Genus *Escherichia coli*, Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.-H. und Stackebrandt, E., The prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria. Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass 6, Springer, New York.
- Wennerås, C.; Neeser, J. R. und Svennerholm, A. M. (1995): Binding of the fibrillar CS3 adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* to rabbit intestinal glycoproteins is competitively prevented by GalNAc β 1-4Gal-containing glycoconjugates, Infect Immun 63 [2], Seite 640-646.
- Whale, A. D.; Garmendia, J.; Gomes, T. A. und Frankel, G. (2006): A novel category of enteropathogenic *Escherichia coli* simultaneously utilizes the Nck and TccP pathways to induce actin remodelling, Cell Microbiol 8 [6], Seite 999-1008.
- Whale, A. D.; Hernandez, R. T.; Ooka, T.; Beutin, L.; Schuller, S.; Garmendia, J.; Crowther, L.; Vieira, M. A.; Ogura, Y.; Krause, G.; Phillips, A. D.; Gomes, T. A.; Hayashi, T. und Frankel, G. (2007): TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*, Microbiology 153 [6], Seite 1743-1755.
- Wieler, L. H.; McDaniel, T. K.; Whittam, T. S. und Kaper, J. B. (1997): Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains, FEMS Microbiol Lett 156 [1], Seite 49-53.
- Wilson, R. K.; Shaw, R. K.; Daniell, S.; Knutton, S. und Frankel, G. (2001): Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*, Cell Microbiol 3 [11], Seite 753-762.
- Wolf, K.; Betts, H. J.; Chellas-Géry, B.; Hower, S.; Linton, C. N. und Fields, K. A. (2006): Treatment of *Chlamydia trachomatis* with a small molecule inhibitor of the *Yersinia* type III secretion system

- disrupts progression of the chlamydial developmental cycle, *Mol Microbiol* 61 [6], Seite 1543-1555.
- Wooley, R. E.; Gibbs, P. S. und Shotts, E. B., Jr. (1999): Inhibition of *Salmonella typhimurium* in the chicken intestinal tract by a transformed avirulent avian *Escherichia coli*, *Avian Dis* 43 [2], Seite 245-250.
- Wu, X. Y.; Chapman, T.; Trott, D. J.; Bettelheim, K.; Do, T. N.; Driesen, S.; Walker, M. J. und Chin, J. (2007): Comparative analysis of virulence genes, genetic diversity, and phylogeny of commensal and enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from weaned pigs, *Appl Environ Microbiol* 73 [1], Seite 83-91.
- Wunderlich, P. F.; Braun, L.; Fumagalli, I.; D'Apuzzo, V.; Heim, F.; Karly, M.; Lodi, R.; Politta, G.; Vonbank, F. und Zeltner, L. (1989): Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing *Enterococcus* SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea, *J Int Med Res* 17 [4], Seite 333-338.
- Xia, Y.; Gally, D.; Forsman-Semb, K. und Uhlin, B. E. (2000): Regulatory cross-talk between adhesin operons in *Escherichia coli*: inhibition of type 1 fimbriae expression by the PapB protein, *EMBO J* 19 [7], Seite 1450-1457.
- Yamamoto, T. und Echeverria, P. (1996): Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans, *Infect Immun* 64 [4], Seite 1441-1445.
- Yu, J. und Kaper, J. B. (1992): Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *Mol Microbiol* 6 [3], Seite 411-417.
- Zeyner, A. und Boldt, E. (2006): Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 90 [1-2], Seite 25-31.
- Zhong, S. S.; Zhang, Z. S.; Wang, J. D.; Lai, Z. S.; Wang, Q. Y.; Pan, L. J. und Ren, Y. X. (2004): Competitive inhibition of adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli*, enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* to intestinal epithelial cell line Lovo by purified adhesin of *Bifidobacterium adolescentis* 1027, *World J Gastroenterol* 10 [11], Seite 1630-1633.
- Zhu, C.; Agin, T. S.; Elliott, S. J.; Johnson, L. A.; Thate, T. E.; Kaper, J. B. und Boedeker, E. C. (2001): Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte Effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1, *Infect Immun* 69 [4], Seite 2107-2115.
- Zhu, C.; Harel, J.; Jacques, M.; Desautels, C.; Donnenberg, M. S.; Beaudry, M. und Fairbrother, J. M. (1994): Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea, *Infect Immun* 62 [10], Seite 4153-4159.
- Zingler, G.; Ott, M.; Blum, G.; Falkenhagen, U.; Naumann, G.; Sokolowska-Köhler, W. und Hacker, J. (1992): Clonal analysis of *Escherichia coli* serotype O6 strains from urinary tract infections, *Microb Pathog* 12 [4], Seite 299-310.
- Zoetendal, E. G.; Collier, C. T.; Koike, S.; Mackie, R. I. und Gaskins, H. R. (2004): Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review, *J Nutr* 134 [2], Seite 465-472.

- Zoetendal, E. G.; von Wright, A.; Vilpponen-Salmela, T.; Ben-Amor, K.; Akkermans, A. D. und de Vos, W. M. (2002): Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces, *Appl Environ Microbiol* 68 [7], Seite 3401-3407.
- Zyrek, A. A.; Cichon, C.; Helms, S.; Enders, C.; Sonnenborn, U. und Schmidt, M. A. (2007): Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair, *Cell Microbiol* 9 [3], Seite 804-816.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A/E	<i>Attaching and Effacing</i>
aEPEC	atypische enteropathogene <i>E. coli</i>
Amp	Ampicillin
AIEC	adhärent-invasive <i>E. coli</i>
APEC	aviär pathogene <i>E. coli</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aroAS	aromatische Aminosäure
AS	Aminosäure
BHI	Hirn-Herz-Bouillon (<i>Brain heart infusion broth</i>)
bp	Basenpaare
BP	Bandpassfilter
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
Ces	<i>Chaperone for E. coli secretion</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcN	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
EDEC	Ödemkrankheit-verursachende <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
Esc	<i>E. coli</i> secretion
Esp	<i>E. coli</i> secreted protein
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser (<i>aqua bidestilata</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horse radish peroxidase</i>)
IgG	Immunglobulin Klasse G
IMT	Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin
IPEC-J2	<i>Intestinal Porcine Epithelial Cells-Jejunum 2</i>
kb	Kilobasen
KBE	koloniebildende Einheit

kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LP	Langpassfilter
MG	Molekulargewicht
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> (Anzahl Bakterien/Wirtszelle)
n	Anzahl
Nal	Nalidixinsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei $\lambda=600$ nm
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii
PI	Propidiumiodid
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sep	<i>Secretion of E. coli protein</i>
SN	Kulturüberstand (<i>supernatant</i>)
SOC	<i>Super Optimal Broth Catabolite Repression</i>
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	Einheit (<i>unit</i>)
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i>
UV	ultraviolett
vs.	versus
λ	Wellenlänge
ν	Teilungsrate
μ	Wachstumsrate

Chemische Elemente und Verbindungen sowie Nukleotide und Aminosäuren wurden gemäß den Empfehlungen der Internationalen Vereinigung für Reine und Angewandte Chemie (IUPAC) abgekürzt.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des LEE nach Dean et al. (2005)	11
Abb. 2: Schematische Darstellung des LEE-kodierten T3SS	12
Abb. 3: Schematische Darstellung der Podestbildung durch EPEC nach Bhavsar et al. (2007)	15
Abb. 4: Schema zum zeitlichen Ablauf des Infektionstests	39
Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von EcN an IPEC-J2.....	60
Abb. 6: Adhäsionsstärke von EcN und Vergleichsstämmen an IPEC-J2 nach 2 h	62
Abb. 7: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von EcN und Vergleichsstämmen an IPEC-J2 nach 2h	63
Abb. 8: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2	64
Abb. 9: Konfokale laserscanningmikroskopische Aufnahme von P2005/03 an IPEC-J2: FAS-Nachweis	65
Abb. 10: Überprüfung von P2005/03 auf das Vorhandensein von EAF-Plasmid und BFP	67
Abb. 11: Infektionsraten von P2005/03 an IPEC-J2 unter Einfluss von EcN.....	70
Abb. 12: Konfokale laserscanningmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 unter Einfluss von EcN	72
Abb. 13: Boxplotdiagramm zur Darstellung der Wertestreuung bei der Quantifizierung der Mikrokolonien von P2005/03 nach Anzahl und Größe.....	75
Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 bei Monoinfektion.....	76
Abb. 15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN	77
Abb. 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 bei Koinkubation von EcN	78
Abb. 17: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 bei Nachinkubation von EcN	79
Abb. 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von P2005/03 an IPEC-J2 unter Einfluss von EcN: Podestbildung	80
Abb. 19: Wachstumskinetik von P2005/03 im Zellkulturüberstand auf IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN	82
Abb. 20: Wachstumskinetik adhärenter P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN.....	84
Abb. 21: Test auf Mikrozinempfindlichkeit von P2005/03	85
Abb. 22: Vergleich Adhäsion EcN Δ <i>foc</i> , EcN Δ <i>fim</i> und EcN Δ <i>focfim</i> an IPEC-J2 nach 2 h.....	86

Abb. 23: Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN Δfoc , EcN Δfim und EcN $\Delta focfim$	87
Abb. 24: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von IMT13962 pCosF1C6 an IPEC-J2 nach 4 h	89
Abb. 25: Vergleich Adhäsion von IMT13962 pCosF1C6 und RZ525 mit EcN und IMT13962-Wildtyp an IPEC-J2 nach 2h.....	90
Abb. 26: Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von IMT13962 pCosF1C6 und RZ525	91
Abb. 27: Bildung von H1-Flagellen durch EcN auf IPEC-J2	93
Abb. 28: EcN $\Delta fliA$ auf IPEC-J2 ohne Bildung von H1-Flagellen.....	94
Abb. 29: REM – Bildung eines Flagellen-Netzwerkes durch EcN auf IPEC-J2.....	95
Abb. 30: Adhäsion EcN $\Delta fliA$ an IPEC-J2 nach 2 h	96
Abb. 31: Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN $\Delta fliA$	97
Abb. 32: Einfluss von Kulturüberständen auf die Infektionsraten von P2005/03 an IPEC-J2	98
Abb. 33: Wachstum von EcN und EcN $\Delta aroA$ in Abhängigkeit von der Zugabe aromatischer Aminosäuren und IPEC-J2-Zellen	101
Abb. 34: Infektionsrate von P2005/03 an IPEC-J2 bei Vorinkubation von EcN $\Delta aroA$ in Abhängigkeit von der Adhäsionsstärke von EcN $\Delta aroA$	102
Abb. 35: Infektionsraten von P2005/03 an IPEC-J2 bei Nachinkubation von der Fimbrienmutanten sowie der Flagellenmutante von EcN	104
Abb. 36: Infektionsraten von E2348/69 an IPEC-J2 bei Vor- und Nachinkubation von EcN.....	105
Abb. 37: Nachweis der durch E2348/69 sezernierten Proteine in DMEM/HAM'S und Kulturüberständen von EcN und MG1655 mittels Silberfärbung	107
Abb. 38: Nachweisgrenzen der durch E2348/69 in DMEM/HAM'S sezernierten Proteine EspA, EspB und Tir und optimale Auftragsmenge Gesamtprotein im Westernblot.....	108
Abb. 39: Nachweis der durch E2348/69 sezernierten Proteine EspA, EspB und Tir in DMEM/HAM'S und Kulturüberständen von EcN und MG1655 mittels Westernblot	109
Abb. 40: Nachweis der virulenzassoziierten Proteine EspA, EspB und Tir in Bakterien von E2348/69 nach Anzucht in DMEM/HAM'S und Kulturüberständen von EcN und MG1655 mittels Westernblot.....	111

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme	24
Tab. 2: Auflistung der verwendeten Plasmide und Vektoren	25
Tab. 3: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide	26
Tab. 4: Auflistung der für die Mutagenese nach Datsenko & Wanner verwendeten Oligonukleotide ...	27
Tab. 5: Auflistung der verwendeten Antikörper	28
Tab. 6: Auflistung der verwendeten Antibiotika und deren Konzentrationen	33
Tab. 7: Auflistung der in der Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesenen Antigene unter Angabe der verwendeten Antikörper	42
Tab. 8: Absorptions- und Emissionsmaxima der eingesetzten Fluorochrome und zugehörige Anregungsfilter/Laser im Epifluoreszenz- bzw. konfokalen Laserscanningmikroskop	43
Tab. 9: Genotypisierung des porcinen <i>E. coli</i> IMT13962 mittels PCR	62
Tab. 10: PCR-Ergebnisse zur Bestimmung des <i>E. coli</i> -Pathotyps von P2005/03	68
Tab. 11: Quantifizierung der Mikrokolonien von P2005/03 nach Anzahl und Größe	74
Tab. 12: Wachstum von EcN Δ <i>aroA</i> auf Nähragar und in Medien mit und ohne aromatische Aminosäuren	100

Danksagung

Ich danke Ihnen, Herr Prof. Dr. Wieler, für die Bereitstellung des sehr interessanten und vielseitigen Themas, Ihre Aufgeschlossenheit gegenüber meinem Quereinstieg, Ihre Unterstützung bei der Durchführung und Finanzierung der Arbeit, die stets für alle Fragen und Diskussionen offene Tür, die Gutachtertätigkeit und nicht zuletzt für Ihre unendliche Geduld.

Ich danke Ihnen, Herr Prof. Dr. Schneider, für die externe Betreuung meiner Arbeit, Ihre tatkräftige Unterstützung bei Stipendiumsanhträgen, die Gutachtertätigkeit sowie auch Ihnen für Ihre Geduld.

Ihnen, Herr Prof. Dr. Simon, danke ich herzlich für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Herr Dr. Peter Schierack hat mich seit Beginn meiner Doktorarbeit ausgezeichnet betreut. Lieber Peter, ich danke Dir für die Überlassung des Themas, für die sehr gute fachliche und persönliche Betreuung, für die mehrmalige Durchsicht dieser Arbeit und konstruktive Kritik und vor allem danke dafür, dass Du mich doch meinen eigenen Weg hast gehen lassen. Ich weiß, es war nicht immer leicht.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Dr. Karsten Tedin. Karsten, Du hast so viel Zeit geopfert, um mich die Grundlagen verstehen zu lernen. Danke für „aber es gibt da einen Trick ...“, wenn eine Methode nicht so klappte, wie sie sollte. Die Diskussionen mit Dir haben mir oft die Freude an der Forschung zurückgegeben. Darüberhinaus möchte ich Dir insbesondere für Deine unermüdliche Hilfe bei der Übersetzung ins Englische danken.

An dieser Arbeit waren so viele weitere fleißige Hände beteiligt. Ich danke Herrn Peter Schwerk, der mir viele Methoden beigebracht hat und immer Zeit für die großen und kleinen Probleme hatte, Herrn Dr. Marcel Nordhoff für die Einführung in die Konfokalmikroskopie und die Hilfe bei der Aufnahme der Bilder, Herrn Dr. Tobias A. Ölschläger (Universität Würzburg) für die Bereitstellung der Fimbrien-Mutanten von EcN und des *foc*-Cosmids sowie Herrn Dr. Wilfried Bleiß (Humboldt-Universität zu Berlin) für die ersten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von EcN auf IPEC-J2. Diese faszinierenden Bilder waren ein Meilenstein dieser Arbeit und haben uns erst sehend gemacht. In diesem Zusammenhang danke ich auch besonders Frau Gudrun Holland (RKI, Berlin) für die Immunogoldmarkierung und die ebenfalls tollen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen unseres aEPEC-Stammes. Ich danke Herrn Prof. Dr. James B. Kaper (University of Maryland, Baltimore) und Herrn Dr. Lothar Beutin (BfR, Berlin) für die Bereitstellung von Antikörpern sowie Herrn Dr. Hartmut Steinrück (BfR, Berlin) für die Serotypisierung unserer *E. coli*-Stämme.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin für die gegenseitige Hilfsbereitschaft und das sehr gute Arbeitsklima.

Ich danke der Berliner Graduiertenförderung (NaFöG) und der FAZIT-Stiftung für die finanzielle Unterstützung in Form von Stipendien und für das damit entgegengebrachte Vertrauen. Ich danke weiterhin der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Probiotikaforschungsprojektes FOR 438, in dessen Rahmen ich meine Forschung durchführen durfte.

Jana, Kathrin und Nicole – danke, dass Ihr Eure wertvolle Zeit geopfert und meine Arbeit Korrektur gelesen habt. Das war eine riesengroße Hilfe, auf die ich nicht hätte verzichten können.

Meine Familie, Ihr seid für mich einfach alles. Ohne Euch wäre ich nicht hier und wäre ich nicht ich. Danke aus tiefstem Herzen für Eure Liebe, Eure Unterstützung und dafür, dass mein Herz voll Glück und Sonnenschein ist, wenn ich bei Euch bin. Ich habe diese Arbeit Mutti und Anke gewidmet, aber Marcus, Andrej, Julian und Jannes seid gewiss, jede einzelne Zeile schrieb ich auch für Euch. Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Schwester Anke. Du bist immer noch meine persönliche Lieblingsbibliothekarin. DANKESCHÖN für Deine Hilfe, die gefundene Literatur auch wirklich einlesen zu können; dafür, dass Du mich vor den Abgründen einer vor Fehlern strotzenden Bibliografie bewahrt hast und vor allem dafür, dass Du Dich so unermüdlich und oft zu später Stunde durch meine Arbeit gekämpft hast.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Berlin, 21. Juli 2008

Sylvia Kleta